

University of Groningen

Het effect van enkele geneesmiddelen op experimentele glomerulonefritis bij de rat

Feenstra, Koop

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1974

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Feenstra, K. (1974). *Het effect van enkele geneesmiddelen op experimentele glomerulonefritis bij de rat*. [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Het effect van
enkele
geneesmiddelen
op experimentele
glomerulonefritis
bij de rat

K. Feenstra

**Het effect van enkele geneesmiddelen
op experimentele glomerulonefritis bij de rat**

door

KOOP FEENSTRA

STELLINGEN

I.

Het is onjuist te spreken over de nefrotoxische nefritis.

II.

Er zijn aanwijzingen dat het optreden van zgn "spikes" bij een immuuncomplex glomerulonefritis in verband staat met het feit dat autologe antigenen in de afgezette immuuncomplexen participeren.

III.

De huidige medische opleiding aan de rijksuniversiteit te Groningen, volgens het zgn "nieuwe curriculum", gaat, gezien het huidige aantal studenten en het aanwezige docentencorps, te zeer uit van de inspanningen en mogelijkheden van de "ideale" medische student.

IV.

De mate van arbeidsgeschiktheid na ziekte of ongeval behoort te worden vastgesteld door een goed opgeleide arbeidsdeskundige in samenwerking en overleg met de verantwoordelijke arts.

V.

Voor het functioneren van een kleuterbureau is een goede samenwerking van de arts-leider en de wijkverpleegster essentieel. De verpleegster dient op de hoogte gebracht te worden van de gegeven adviezen.

VI.

In verband met de specifieke bouw en physiologie van de placenta, dient men bij de beoordeling van de microscopie terdege rekening te houden met de oorspronkelijke localisatie van het genomen bipt.

VII.

Voor de diagnosestelling van een congenitale bijnier hyperplasie is een gaschromatografie op steroid hormoon derivaten van de urine een vrij eenvoudige, betrouwbare methode.

VIII.

Aan de methode van conservering van homoio trommelvliezen voor transplantatie is nog onvoldoende aandacht besteed.

IX.

Bij de diagnostiek van het asplenie- en het polyspleniesyndroom op de zuigelingenleeftijd wordt aan de angiografische beoordeling van het verloop van de aorta en de vena cava inferior en de relatie tussen beide onvoldoende aandacht geschonken.

X.

Eén van de grotere gevaren voor de tegenwoordige samenleving is een voortgaande verving van het "ik mag . . ." in het "ik heb recht op . . .".

XI.

Indien de hockey-scheidsrechter de voordeel-regel correct toepast, kan gesteld worden, dat hij functioneert met een snelheid gelijk aan een hoogwaardige computer.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that proper record-keeping is essential for transparency and accountability, particularly in financial matters. The text outlines various methods for organizing and storing data, including digital databases and physical filing systems. It also mentions the need for regular audits and reviews to ensure the integrity of the information.

2. The second section focuses on the role of communication in achieving organizational goals. It highlights the importance of clear and concise communication, both internally and externally. The text provides guidelines for effective communication, such as using appropriate language, listening actively, and providing feedback. It also discusses the benefits of open communication and how it can foster a collaborative work environment.

3. The third part of the document addresses the challenges of managing resources and time. It acknowledges that resource allocation is a complex task that requires careful planning and prioritization. The text offers strategies for managing time effectively, such as setting priorities, delegating tasks, and avoiding distractions. It also discusses the importance of monitoring resource usage and making adjustments as needed.

4. The final section discusses the importance of continuous learning and improvement. It emphasizes that organizations must stay up-to-date with the latest trends and technologies to remain competitive. The text encourages a culture of learning, where employees are encouraged to seek out new knowledge and skills. It also mentions the importance of regular training and development programs to ensure that the workforce is equipped with the necessary skills for the future.

RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

**Het effect van enkele geneesmiddelen
op experimentele glomerulonefritis bij de rat**

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van het doctoraat in de geneeskunde
aan de Rijksuniversiteit te Groningen
op gezag van de Rector Magnificus Dr A. Wattel
in het openbaar te verdedigen op
woensdag 27 maart 1974 des namiddags te 16.00 uur

door

KOOP FEENSTRA
geboren te Paré-Paré (Celebes)

1974

DRUKKERIJ HAVÉ B.V. - GRONINGEN

PROMOTOR: prof. dr Ph. J. HOEDEMAEKER

CO-PROMOTOR: prof. dr A. ARENDS

Dit proefschrift werd bewerkt in het Pathologisch Anatomisch Laboratorium van de Rijksuniversiteit te Groningen (prof. dr A. Arends, prof. dr H. N. Hadders).

De immunologische technieken werden verzorgd door mevr. R. v. d. Lee-Bisperink en mevr. H. A. Greben-Wiersema (afd. immuno-pathologie, prof. dr Ph. J. Hoedemaeker).

Het materiaal voor elektronen- en immuno-elektronen microscopie werd bewerkt door mevr. A. Nijkeuter-Boes (afd. immunopathologie) in het Medisch Centrum voor Elektronenmicroscopie (dr I. Molenaar).

Het lichtmicroscopisch materiaal werd bewerkt door mevr. S. S. Banki-Neisingh en mej. N. H. Nakken.

De verzorging van de proefdieren was in de vertrouwde handen van de heren M. Venema en A. F. Jager.

De heer D. Elzinga tekende de grafieken en schema's.

De heren W. Oosterwijk en H. Wieringa (afd. fotografie) verzorgden het fotografisch materiaal.

Statistische hulp werd verkregen van de heer H. J. Bronts (Inst. voor Sociale geneeskunde).

De heer R. Wegener vertaalde de samenvatting.

Het manuscript werd getypt door mej. T. Helmholt.

Het experimentele werk dat hier wordt beschreven werd mede mogelijk gemaakt door financiële steun van de „Nierstichting Nederland”.

HOOFDSTUK I:	INLEIDING	blz. 9
HOOFDSTUK II:	EXPERIMENTELE GLOMERULONEFRITIS (EGN)	blz. 11
	a. De verschillende modellen:	blz. 11
	b. De verhouding EGN t.o.v. de menselijke glomerulonefritis	blz. 13
HOOFDSTUK III:	DE INVLOED VAN GENEESMIDDELEN BIJ MENSELIJKE- EN EXPERIMENTELE GLOMERULONEFRITIS	blz. 15
	a. Therapie bij menselijke glomerulonefritis	blz. 15
	b. Therapie bij EGN	blz. 16
HOOFDSTUK IV:	MATERIALEN EN METHODEN	blz. 17
	a. Proefdieren	blz. 17
	b. Bereiding van antigenen	blz. 17
	c. Bereiding en zuivering van antisera	blz. 18
	d. Eiwitbepaling in de urine	blz. 21
	e. Licht microscopie	blz. 21
	f. Fluorescentie microscopie	blz. 21
	g. Elektronen microscopie	blz. 22
	h. Immuno-elektronen microscopie	blz. 22
	j. Geneesmiddelen	blz. 23
HOOFDSTUK V:	GEKOZEN MODELLEN VAN EGN	blz. 24
	Nefrotoxische glomerulonefritis	blz. 24
	Complex glomerulonefritis	blz. 25
HOOFDSTUK VI:	RESULTATEN	blz. 28
	a. Het natuurlijke beloop (NH)	blz. 28
	b. Het effect van geneesmiddelen	blz. 30
	c. Samenvatting resultaten	blz. 40
HOOFDSTUK VII:	DISCUSSIE	blz. 44
	a. Het model	blz. 44
	b. Het natuurlijke beloop	blz. 45
	c. Het effect van geneesmiddelen	blz. 49
	d. Samenvatting en conclusie	blz. 55
	e. Conclusie voor de menselijke pathologie	blz. 56
HOOFDSTUK VIII:	SAMENVATTING	blz. 58
HOOFDSTUK IX:	SUMMARY	blz. 61
	LITERATUURLIJST	blz. 66
	GRAFIEKEN	blz. 72
	FOTO'S	blz. 79

Aan: Vader en Moeder

*Voor: Marianne
Margreeth, Hanneke en Tjallien*

Het verschijnen van dit proefschrift werd mede mogelijk gemaakt
door financiële steun van:

Merck Sharp & Dohme B.V.
„Nierstichting Nederland”

INLEIDING

In 1827 gaf BRIGHT (17) als eerste een beschrijving van enkele patiënten, lijdende aan een nierziekte, die gepaard ging met proteinurie en haematurie. Deze beschrijving, die glomerulaire veranderingen verantwoordelijk stelde voor de afwijking in de urine, geldt als het begin van het onderzoek van glomerulonefritis. Hoewel BRIGHT (18) in 1836 reeds verband probeerde te leggen tussen het optreden van glomerulonefritis en een doorgemaakte infectieziekte, in casu roodvonk, trachtte SCHICK (104) pas in 1907 de relatie tussen een doorgemaakte infectieziekte en de daarna optredende glomerulonefritis verder uit te werken. Hij wees op de overeenkomst tussen de latente periode, die verliep tussen een doorgemaakte infectie en het optreden van glomerulonefritis en een vergelijkbare latente periode bij de zogenaamde serumziekte bij patiënten, welke op kan treden ca. 10 dagen na toediening van serum. Hij sprak het vermoeden uit dat tijdens deze latente fase anti-lichamen tegen een streptococcon antigeen zouden worden geproduceerd en dat deze antilichamen toxisch voor de nier zouden zijn. De idee, dat een immunologisch proces ten grondslag kon liggen aan glomerulonefritiden, werd zo al vroeg geboren. Het verder uitwerken van de ideeën van BRIGHT en SCHICK werd bemoeilijkt door het feit, dat de onderzoekers voor 1900 werkten met menselijk materiaal. Zodoende konden zij bij hun onderzoeken meestal slechts een vaag idee verkrijgen over het exacte moment waarop de ziekte was begonnen. Het onderzoek naar het beloop van de ziekte berustte uitsluitend op klinische waarnemingen, gesteund door enkele biochemische bepalingen. Voor histologisch onderzoek waren zij aangewezen op weefsel, dat post-mortaal was verkregen.

Om het beloop van een glomerulonefritis beter histologisch te kunnen vervolgen en tevens om de pathogenetische mechanismen te kunnen onderzoeken, ontstond de behoefte aan experimentele, bij proefdieren opgewekte, glomerulonefritiden. Bij een experimenteel model van glomerulonefritis beschikt men over een nauwkeurig vast te stellen begin, kent men de oorzakelijke factor(en) en is het beeld van moment tot moment wat betreft functie en histologie te vervolgen.

Als basis voor experimentele glomerulonefritis uit die tijd herkent men reeds twee patronen:

- a. de gedachte van SCHICK (104) die, zoals boven vermeld, verband trachtte te leggen tussen serumziekte en glomerulonefritis en
- b. de idee dat er bij een infectieziekte een nefrotoxische stof (c.q. antilichaam) zou ontstaan, die de nier direkt kon beschadigen.

Naar analogie van de eerste hypothese wees LONGCOPE (78) er in 1913 op, dat herhaalde injecties met lichaamsvreemde (heterologe) eiwitten in staat waren een glomerulonefritis bij het konijn op te wekken.

De tweede hypothese bracht LINDEMANN (75) er toe caviae te immuniseren

met een homogenaat van konijnennieren. De op deze wijze opgewekte antilichamen, bleken na inspuiting bij konijnen afwijkingen te veroorzaken in de nieren. Helaas besteedde LINDEMANN in zijn publikatie slechts aandacht aan de tubulaire veranderingen en meldde hij niets over eventuele glomerulaire afwijkingen. Het was vervolgens MASUGI (81, 82, 83), die de rol van anti nier antilichamen verder onderzocht (zie hoofdstuk II).

De twee hierboven vermelde hypothesen vormen tot op heden de belangrijkste pijlers van de experimentele glomerulonefritis.

Hoewel experimentele glomerulonefritiden in de eerste decennia van deze eeuw werden ontwikkeld (LINDEMANN 75, LONGCOPE 78, MASUGI 81, 82, 83), vorderde het experimentele werk slechts langzaam. In de laatste vijftien jaar echter is de ontwikkeling van de experimentele glomerulonefritis, met de toename van de kennis der immunologie en de opkomst van nieuwe technieken, in een ware stroomversnelling terecht gekomen. Aangezien deze immunologische inzichten en technieken ook bij de menselijke glomerulonefritis van toepassing bleken en bovendien door middel van naaldbiopsieën uit de nier, de histologie ook bij de mens beter vervolgbaar bleek, zijn het inzicht in pathogenese en beloop van glomerulonefritiden enorm verbreed en uitgediept.

Doel van het hier omschreven onderzoek:

In dit proefschrift zullen twee vormen van experimentele glomerulonefritis bij de rat aan de orde komen. De invloed, die een aantal in de menselijke pathologie gebruikte geneesmiddelen op het beloop van deze experimentele glomerulonefritis hebben, wordt bestudeerd aan de hand van licht-, fluorescentie- en elektronenmicroscopie.

EXPERIMENTELE GLOMERULONEFRITIS (EGN)

A. de verschillende modellen

De laatste jaren zijn vele vormen van EGN beschreven, die, op immunologische gronden, steeds in twee hoofdgroepen onderverdeeld kunnen worden, te weten: I. een groep EGN waarbij de glomerulonefritis wordt veroorzaakt door antilichamen gericht tegen de glomerulaire basaalmembraan (GBM). De GBM zelf bevat hier dus het antigeen of de antigenen, die in staat zijn de antilichamen op te wekken. Een glomerulaire beschadiging zal volgen op een binding van deze antilichamen aan de GBM. In deze hoofdgroep kan men een onderverdeling aanbrengen, n.l.:

I-a. Een EGN waarbij sprake is van antilichamen van het dier zelf (autologe antilichamen), gericht tegen zijn eigen GBM. Deze vorm is het eerst beschreven door STEBLAY (114) en later o.a. door LERNER e.a. (71, 72).

I-b. Een groep EGN waarbij sprake is van heterologe antilichamen tegen de GBM gericht. Hier krijgen we te maken met een tweeledig immunologisch gebeuren. Een eerste z.g.n. heterologe fase, waarbij het heterologe antilichaam reageert met de GBM en een tweede, z.g.n. autologe fase, waarbij het dier antilichamen gaat produceren tegen het in zijn GBM afgezette heterologe antilichaam. Deze vorm staat in de literatuur bekend als de nefrotoxische glomerulonefritis (MASUGI 81, 82, 83, UNANUE 121 t/m 126).

De afzetting van antilichamen in deze beide groepen experimentele glomerulonefritis is met immunofluorescentie zichtbaar te maken als een lineaire hechting aan de GBM. (foto 1)

II. Een groep EGN waarbij sprake is van in het bloed circulerende, oplosbare, antigeen-antilichaam complexen, die kunnen worden afgezet in of langs de GBM. Het antigene bestanddeel van de immuuncomplexen kan van velerlei oorsprong zijn, zowel autoloog (BIELSCHOWSKY 15, EDGINGTON 35, 36, 37, GLASSOCK 49, HELYER 55, HEYMANN 58, LAMBERT 69, LINDER 76) alsook heteroloog (BANKS 9, CHEVILLE 25, DIXON 30, 31, 32, 33, GERMUTH 46, 47, 48, LERNER 70, LINDBERG 74, MELLORS 89, OLDSTONE 97, SUN 115, 116, PORTER 98, VOSTI 133). Ook bij „spontane” glomerulonefritiden, die bij proefdieren zijn beschreven, kunnen immuuncomplexen een belangrijke rol spelen (BIELSCHOWSKY 15, HELYER 55, LAMBERT 69, LINDER 76, MELLORS 89). Men kan in deze groep een vergelijkbare onderverdeling aanbrengen als in groep I, op grond van het karakter van de antilichamen, n.l.:

II-a. Een groep EGN waarbij autologe antilichamen een onderdeel van het immuuncomplex vormen.

II-b. Een groep experimentele glomerulonefritiden waarbij sprake is van heterologe antilichamen als deel van het immuuncomplex. Hierbij zal evenals in

groep I-b, sprake zijn van twee fasen; een heterologe fase, waarin het heterologe antilichaam zich met het antigeen bindt en een tweede, autologe fase, waarin de gastheer zelf antilichamen gaat produceren tegen het heterologe antilichaam in de immuuncomplexen. Opgemerkt moet worden dat bij deze vorm van EGN natuurlijk ook antigenen van autologe of heterologe oorsprong kunnen zijn. Dit heeft echter geen invloed op het al of niet optreden van een autologe fase.

Voor beide groepen geldt dat, wanneer immuuncomplexen in de GBM worden afgezet, ze met immunofluorescentie zichtbaar zijn te maken. Hierbij is een korrelig fluorescentie patroon te zien langs de GBM (foto 2).

Voor een uitgebreid overzicht van de verschillende vormen van EGN en hun pathogenese, moge ik verwijzen naar VAN ES (39). Een schematische samenvatting hiervan is gegeven op pg 14.

Hoewel in de inleiding werd gesteld, dat men bij een EGN de oorzakelijke factor(en) denkt te kennen, blijkt dat in de praktijk toch vaak moeilijkheden op te leveren. Zo blijken de nefrotoxische nefritis (MASUGI 81, 82, 83, UNANUE 121 t/m 126) en een bepaalde vorm van immuuncomplex glomerulonefritis (VAN ES, 39), die gelden als voorbeelden van respectievelijk groep I en groep II, *beide* veroorzaakt te kunnen worden door toediening van heterologe antilichamen, die werden opgewekt door immunisatie met een homogenaat van nierschors van de rat, afhankelijk van de bereidingswijze. Kennelijk bevat het nierschors homogenaat verschillende antigenen, die meerdere, essentieel van elkaar verschillende, antilichamen kunnen opwekken.

Zo blijkt het antigeen, betrokken bij de immuuncomplex glomerulonefritis als beschreven door VAN ES (39) gelokaliseerd te zijn in de borstelzoom van de proximale tubulus van de rattenier. Bij zuivering van dit antigeen werd duidelijk, dat alle antigene eigenschappen waren gelokaliseerd in de fractie α -5 van het Fx₁A, verkregen na differentiële centrifugering van een nierschors homogenaat. Het bleek GRUPE (51) en BOSS (16), dat er meerdere antigenen uit de borstelzoom van de niertubulus van de rat in staat waren tot het opwekken van antilichamen.

Hetzelfde kan ook gezegd worden van de nefrotoxische nefritis. MASUGI (81) wekte een nefrotoxische nefritis op, door dieren in te spuiten met heterologe antilichamen, opgewekt door immunisatie met nierschors homogenaat. Dat bij deze immunisatie de antigenen uit de GBM op de voorgrond stonden, bleek uit het feit, dat bij immunofluorescentie onderzoek van op dergelijke wijze verkregen nefritiden (UNANUE 121 t/m 126), een lineaire hechting van de antilichamen aan de GBM aangetoond werd. SHIGEMATSU (110) nam waar, dat bij langer vervolgen van een door hem opgewekte nefrotoxische nefritis, naast een lineaire fluorescentie ook een granulaire fluorescentie optrad. Dit zou kunnen duiden op participatie van andere antigenen dan afkomstig uit de GBM, die aanwezig zijn in het door hem gebruikte nierschors homogenaat en aanleiding zijn tot de vorming van immuuncomplexen, die worden afgezet in de GBM. Onderzoekingen naar het wezen van deze EGN doen inderdaad vermoeden, dat meerdere antigenen dan alleen GBM antigeen hierbij een rol kunnen spelen (VAN ES 39). Hieruit blijkt, dat immunisaties van proefdieren met nierschors homogenaat, in staat zijn meer dan één antilichaam op te wekken, afhankelijk van het antigeen of de antigenen, die er bij is/zijn betrokken.

Bovenstaande geeft duidelijk aan, hoe moeilijk het is van één bepaalde vorm van EGN te spreken. De oorspronkelijk door MASUGI (81) beschreven vorm van EGN kan, afhankelijk van het karakter van de bij het proefdier opgewekte antilichamen of meer op een nefrotoxische of meer op een immuuncomplex glomerulonefritis lijken. Het is daarom niet goed mogelijk verschillende vormen van glomerulonefritis met elkaar te vergelijken, tenzij de betrokken antigenen zó ver gezuiverd zijn, dat inderdaad van één antigeen kan worden gesproken. Want een nefrotoxische nefritis met een dergelijk gezuiverd antigeen opgewekt, laat, ook na langer vervolgen, slechts een lineaire fluorescentie zien (WILSON 137). Een immuuncomplex glomerulonefritis, opgewekt met de gezuiverde fractie α -5 van het Fx₁A, geeft een onderling vergelijkbare immuuncomplex glomerulonefritis.

B. verhouding EGN ten opzichte van menselijke glomerulonefritis

Het hierboven beschrevene voor de EGN geldt in wezen ook voor de verschillende menselijke glomerulonefritiden. Ook hier kunnen in principe twee immunologisch-pathogenetische modellen worden onderscheiden. Echter binnen de groep van de immuuncomplex glomerulonefritiden kan het beloop zeer gevarieerd zijn, hetgeen mogelijk mede wordt veroorzaakt door participatie van sterk van elkaar verschillende antigenen. Ook kunnen deze vormen belangrijke morfologische verschillen tonen.

Het is duidelijk, dat mede hierdoor het vergelijken van EGN en menselijke glomerulonefritis een hachelijke zaak wordt. Niet alleen moet men rekening houden met duidelijk verschil in nieren van mens en dier, maar ook met verschil in reactievermogen, verschillende vaak onbekende antigenen en vaak onbekende tijdsintervallen. Niettemin zal men EGN en menselijke glomerulonefritis slechts kunnen vergelijken op de volgende punten:

De wijze waarop immuuncomplexen en/of anti-GBM-antilichamen in glomeruli worden afgezet, schade veroorzaken en eventueel reageren op medicatie. Het is ondermeer om deze reden, dat wij de invloed van geneesmiddelen op één bepaalde vorm van een immuuncomplex glomerulonefritis bestudeerden, waarbij de vorm, grootte en plaats van de afgezette immuuncomplexen, c.q. complex aggregaten, van groter belang zijn dan het type van de EGN.

SCHEMA I

	Experimenteel model	Menselijke vorm
I. Glomerulonefritis op basis van Antilichamen tegen GBM.		
A. Autologe Antilichamen	Stebly nefritis (71, 72, 114)	Glomerulonefritis bij Goodpasture (65, 66, 84) „zuivere” anti-GBM Glomerulonefritis (65, 88, 108)
B. Heterologe Antilichamen	Nefrotoxische nefritis (81, 82, 83, 121 t/m 126) Glomerulonefritis na Anti-Lymfocyten serum bij Apen (8, 44, 136)	?
II. Glomerulonefritis op basis van circulerende, oplosbare immuun-complexen		
A. Antigeen en Antilichaam zijn Autoloog	„Heymann” nefritis (48, 58, 35, 36, 37, 16, 51) „spontane” glomerulonefritis bij de NZB-muis (33, 55, 89, 103, 69)	Glomerulonefritis bij SLE (3, 14, 67, 105) Mixed cryoglobuline nefritis (43) Nefrotisch syndroom bij bronchus tumor (73) Glomerulonefritis bij thyreoïditis (106)
B. Antigeen is heteroloog, Antilichaam is autoloog	Serumziekte nefritis (30, 31, 32, 46, 47, 48) Glomerulonefritis na bacteriële infecties (74, 120) Glomerulonefritis na virale infecties (19, 25, 79, 89, 97, 115, 116)	Glomerulonefritis na bacteriële infecties, b.v. post-streptococcen infecties (63, 108, 138) Serumziekte nefritis (4) Glomerulonefritis na virale infecties (112) Glomerulonefritis na parasitaire infecties (135) Glomerulonefritis na geneesmiddelen (68)
C. Antigeen is autoloog, Antilichaam is heteroloog	Glomerulonefritis Hfdst. V	Geen bekend

DE INVLOED VAN GENEESMIDDELEN BIJ MENSELIJKE- EN EXPERIMENTELE GLOMERULONEFRITIS

A. Therapie bij menselijke glomerulonefritis

Aangezien het overgrote deel der glomerulonefritiden een immunologische reactie heeft, die een ontstekingscomponent in de glomeruli tot gevolg heeft, heeft men getracht het beloop van glomerulonefritiden te beïnvloeden met die geneesmiddelen, waarvan men verwachtte of hoopte, dat ze zowel effect zouden hebben op de ontstekingscomponent als op het immunologisch gebeuren. Vanuit deze gedachtengang is men er toe gekomen de corticosteroiden en/of de immuunsuppressiva als therapie toe te passen. Een zeer uitgebreide literatuur hierover is aanwezig. Wij zullen niet uitgebreid ingaan op deze literatuur. Slechts enkele voor ons relevante artikelen zullen nader worden genoemd. Het was CAMERON-1971 (22, 23), die deze literatuur in een tweetal fraaie overzichtsartikelen samenvatte. Hieruit en uit de recentere literatuur, waarvan hier slechts enkele worden aangehaald (34, 87, 95, 111), blijkt dat er slechts af en toe pogingen tot „controlled trials” werden gedaan (GREIFFER, 50a). Het opzetten van een dergelijke trial zal ook zeer moeilijk blijven zolang er onvoldoende bekend is over de exacte mechanismen, die in de menselijke glomerulonefritis een rol spelen en gezien ook de grote variaties in het klinische beloop. Bovendien is het zeer moeilijk patiënten in dezelfde fase van het ziekteproces, d.w.z. in een zelfde stadium van glomerulaire beschadiging, geneesmiddelen toe te dienen. Uit de verkregen resultaten blijkt, dat niet is aangetoond dat immuunsuppressiva of corticosteroiden een verbetering geven van de glomerulonefritis. De af en toe beschreven verbetering bij membraneuze glomerulonefritis zou niet door de behandeling komen, maar berusten op spontane remissies van het ziekteproces (LAVER, 69a). Een combinatie van corticosteroiden en immuunsuppressiva zou echter een gunstig effect hebben bij chronische proliferatieve glomerulonefritis (MUKHERJEE, 95). Ook wordt een gunstige invloed gemeld van immuunsuppressiva, met name het azathioprine (imuran) en het cyclofosfamide (endoxan) bij glomerulonefritis tengevolge van SLE (HAYSLETT 54, DONADIO 34, CAMERON 22, 23).

Over het geheel genomen kan men echter stellen dat de therapie met immuunsuppressiva nog niet aan de gestelde verwachtingen heeft beantwoord.

De ironie wil echter, dat een nefrotisch syndroom waarbij een immunologische grondslag als uiterst onwaarschijnlijk moet worden beschouwd en waarbij bovendien een ontstekingscomponent geheel ontbreekt („minimal change” disease), duidelijk en significant verbetert bij behandeling met corticosteroiden (VAN ACKER 1, BARRATT 11, 12, SOOTHILL 113). Ook de immuunsuppressiva als imuran en endoxan blijken verbetering te geven bij deze aandoening (CHIN 26, BARRATT 11, 12, SOOTHILL 113).

De laatste tijd is het antiflogisticum indomethacine (indocid) in de belangstelling gekomen als therapie bij glomerulonefritis, waarbij door enkelen een gunstig effect op de proteinurie wordt beschreven (MICHIELSEN 91, 92, 93, CONTE 28). Het werkingsmechanisme hiervan is onduidelijk, temeer daar aan

indocid geen immuunsuppressieve werking wordt toegeschreven (MARMONT 80).

Als aparte groep geneesmiddelen moet verder nog worden genoemd de anti-stollings middelen. Met name VASSALLI (127, 128, 129) en McCLUSKEY (85, 86) zijn pleitbezorgers voor deze therapie. Zij wijzen op het beschadigende effect van stolling bij diverse glomerulonefritiden, zowel bij de mens als bij het proefdier. Toch speelt de therapie met o.a. heparine in de menselijke nierpathologie nog geen belangrijke rol, hoewel enkele opmerkelijke resultaten zijn bereikt, zoals uit de tot nu bekende casuistische mededelingen en kleine series patiënten blijkt (KINCAID-SMITH 64, HERDMAN 57, ARIEFF 5), melden anderen geen resultaten (MIHARA 93a). Van een systematisch onderzoek naar het effect van anti-coagulantia in de menselijke nierpathologie is echter (nog) geen sprake.

B. Therapie bij EGN

De literatuur over therapie bij experimentele glomerulonefritiden is lang niet zo uitgebreid als de literatuur over therapie bij menselijke glomerulonefritiden.

Een positief resultaat van immuunsuppressiva, met name het endoxan, op glomerulonefritis bij proefdieren, wordt gemeld door CAEY (21) en RUSSELL (103). Zij melden een duidelijke vermindering van sterfte en een duidelijk minder ernstig histologisch beeld bij de spontane glomerulonefritis bij de NZB-muis, indien deze proefdieren vroegtijdig worden behandeld met endoxan.

Op nefrotoxische nefritis zouden immuunsuppressiva slechts een zeer gering tot geen resultaat hebben (DAHA, pers. mededelingen). SY LIM (117) ziet geen enkel effect noch van corticosteroiden noch van immuunsuppressiva bij een experimentele autologe immuuncomplex („Heymann”) glomerulonefritis, evenals BARABAS (10).

Corticosteroiden zouden evenmin effect hebben op het beloop van proteïnurie bij nefrotoxische nefritis (HACKEL 52, LIPPMAN 77), hoewel MISRA (94) wel een duidelijk positief effect meldt op de proteïnurie bij nefrotoxische glomerulonefritis bij behandeling met prednison.

Indocid is bij experimentele glomerulonefritis ook nog niet op uitgebreide schaal toegepast. DAHA (29) meldt een gunstig effect op het proteïnurie beloop bij nefrotoxische nefritis bij ratten indien deze worden behandeld met indocid. De onderliggende nefritis zou echter niet beïnvloed worden. Eenzelfde resultaat komt naar voren indien indocid wordt toegepast bij een autologe immuuncomplex glomerulonefritis naar het model van HEYMANN in de rat (GRIBNAU, pers. mededeling).

VASSALLI (127, 128, 129) wijst op het positieve effect van anti-stollingstherapie in EGN. Ook BALIAK (7) en MIHARA (93a) geven een positief resultaat aan bij het gebruik van anti-stollingstherapie in experimentele glomerulonefritis modellen.

MATERIALEN EN METHODEN

A. PROEFDIEREN

Voor het opwekken van experimentele glomerulonefritis werd uitsluitend gebruik gemaakt van de vrouwelijke random bred Wistar rat uit eigen kweek. De leeftijd van de dieren bij de aanvang van de proef was steeds drie maanden plus of min één week. Het aanvangsgewicht varieerde van 175 tot 200 gram.

Het gebruik van vrouwelijke ratten verdiende de voorkeur boven het gebruik van mannelijke ratten, omdat de in de Wistar rat spontaan optredende proteïnurie bij vrouwtjes veel lager is dan bij mannetjes (1 : 5). Bovendien treedt bij mannelijke Wistar ratten, speciaal na nefrectomie, na verloop van enkele maanden een lokale-fokale glomerulosclerose op, die het vervolgen van eventuele morfologische afwijkingen tengevolge van EGN in gevaar zou kunnen brengen. Deze glomerulosclerose na éénzijdige nefrectomie wordt bij vrouwtjes veel later gezien, in elk geval na de drie maanden gedurende welke periode de glomerulonefritis bestudeerd werd (ELEMA, 38).

B. BEREIDING VAN ANTIGENEN

1. Ratten glomerulaire basaalmembraan antigenen

Er werd uitgegaan van met NaCl 0,9 % geperfundeerde nieren, afkomstig van Wistar ratten van verschillende leeftijd en geslacht. De nieren werden gedecorticeerd en uit de nierschors werden vervolgens de glomeruli geïsoleerd op de manier, zoals beschreven door VAN ES (39) en DAHA (29).

De aldus verkregen glomeruli werden gesuspenderd in NaCl 0,9 % en gedurende twee maal drie minuten gedestruëerd in een MSE-sonicator bij maximale voltage. De ratten GBM-bestanddelen werden gescheiden van de cellulaire componenten door centrifugering bij 3000 rpm gedurende 19 min. Het neerslag werd gedialyseerd tegen aquadest, daarna gevriesdroogd en bewaard bij -20°C .

Voor het bereiden van GBM-antigenen, te gebruiken voor absorptie, werd uitgegaan van niet geperfundeerde rattennieren, terwijl na destructie door middel van de sonicator niet werd gecentrifugeerd. Op deze wijze werd een mengsel verkregen, waarin naast GBM-antigenen, ook nog cellulaire- en bloed bestanddelen aanwezig waren.

2. Nierschors antigenen volgens Shibata (109)

Niet geperfundeerde nieren van Wistar ratten van verschillende leeftijd en geslacht, werden gedecorticeerd. Twaalf gram nierschors werd gehomogeniseerd in 0,1 M Na-Boraat gebufferd 0,9 % NaCl, pH 8. Bij het homogenaat werd 100 mg kristallijn trypsine gevoegd, wat gedurende drie uur bij 37°C onder voortdurend roeren kon inwerken. Iedere 30 min. werd de pH bijgesteld. Na drie uur werd het trypsine geïnactiveerd door verhitting van het mengsel tot

60°C, in een water bad, gedurende 30 min. Vervolgens werd 35 min. gecentrifugeerd bij 27000 rpm. Het neerslag werd twee maal gewassen in 0,9 % NaCl. Uiteindelijk werd het neerslag gesuspenderd in 20 cc 0,9 % NaCl.

3. Fractie 1A van de ratten tubulus-homogenaat (Fx₁A)

Fx₁A werd verkregen volgens de methoden van Edgington (36). Nierschors van Wistar ratten werd door een koperen zeef (180 mesh) gewreven. Het gezeefde materiaal werd gesuspenderd in fosfaat gebufferd zout (PBZ) pH 7,2 en vervolgens gedurende 10 min. gecentrifugeerd bij 400 g. Het supernatant werd vervolgens gedurende 45 min. gecentrifugeerd bij 70.000 g. Het laatste sediment werd droog gevoren en bewaard bij -20°C.

4. Ratten IgG

Uit ratten serum werd het globuline neergeslagen volgens de uitzoutings methode met verzadigd ammoniumsulfaat (CAMPBELL 24). Uit het zo verkregen serum globuline werd het IgG gezuiverd via kolom-chromatografie met DEAE-sephadex. Als elutie buffer werd gebruikt PBZ pH 7,2. Het via elutie verkregen IgG werd droog gevoren en bewaard bij -20°C.

5. Ratten complement

Ter verkrijging van ratten complement (C') uit serum, werden eerst in vitro complexen vervaardigd van BSA-konijnen anti-BSA, zodanig, dat een optimale precipitatie werd verkregen. Het precipitaat werd gewassen in PBZ pH 7,2. Vlak voor de immunisatieprocedure werd dit precipitaat geïncubeerd gedurende 30 min. bij 37°C met vers ratten serum, teneinde C' uit dit serum te binden. Het aldus verkregen precipitaat waaraan C' was gebonden, werd 3 × gewassen in PBZ pH 7,2 en afgedraaid.

6. Horse-Radish Peroxydase

Horse-Radish peroxydase (peroxydase) werd direkt betrokken van Boeringer Mannheim.

C. BEREIDING EN ZUIVERING VAN ANTISERA

1. Immunisatie procedure

a. Antisera tegen bovengenoemde antigenen werden steeds bereid in konijnen van de Witte Wener stam (TNO-Zeist), uitgezonderd één batch antiserum gericht tegen nierschors antigeen, dat werd bereid in „boeren”konijnen (Centrale dienst proefdieren, RU-Groningen). Antisera gericht tegen ratten GBM, ratten IgG, ratten C' en peroxydase werden opgewekt volgens de onderstaande procedure: Eén week voor het begin van de immunisatie kregen de konijnen steeds 1 cc compleet Freund's Adjuvant intramusculair (i.m.) toegediend. Vervolgens werd een 1/2 cc van het antigeen, vermengd met een 1/2 cc compleet Freund's Adjuvant, intracutaan (i.c.) in de rug huid ingespoten, verdeeld over tien injecties van 0,1 cc. Deze procedure werd twee maal herhaald met tussenpozen van tien dagen.

Tien dagen na de laatste injecties werd 5 cc bloed afgetapt uit een oorvene.

Met het serum hiervan werd een dubbele agar diffusie test volgens OUGTHER-LONY en een immuno-elektroforese ingezet tegen het antigeen, waarmee geïmmuniseerd was. Indien antilichamen in voldoende sterkte werden aangetoond, werd 40 cc bloed afgetapt. Na intraveneuze boostering werd 20 dagen later opnieuw bloed afgetapt. Het serum hiervan werd gepooled en bewaard bij -20°C .

Voor de totale immunisatie procedure werd gebruik gemaakt van de volgende hoeveelheden:

ratten GBM van 18 ratten; 30 mg ratten IgG; 30 mg BSA-anti BSA complexen waaraan ratten C' was gekoppeld; 30 mg peroxydase.

b. Voor immunisatie met nierschors antigenen werd de volgende procedure gevolgd:

Eén week voor het begin van de immunisatie procedure, kreeg het konijn een $1\frac{1}{2}$ cc compleet Freund's Adjuvant intramusculair in elke achterpoot. Eén week hierna kregen de beesten een $1\frac{1}{2}$ cc nierschors antigeen in compleet Freund's Adjuvant direkt in de lieslymfklieren van beide zijden gespoten. Twee weken hierna kregen de beesten een i.c. booster van nog eens 1 cc nierschors antigeen in compleet Freund's Adjuvant, verdeeld over vier plaatsen in de achterpoten. Tien dagen na deze i.c. booster werd 5 cc bloed afgetapt. Het daaruit verkregen serum werd in de dubbele agar diffusie test en in immuno-elektroforese onderzocht op de aanwezigheid van antilichamen tegen nierschors antigeen. Indien fraaie precipitatie lijnen werden verkregen, werden de beesten i.v. geboosterd. Tien dagen daarna werd 40 cc bloed afgetapt uit een oorvene.

Indien na de eerste i.c. booster geen fraaie precipitatie lijnen werden gevonden, werd een tweede i.c. booster gegeven. Na deze tweede i.c. booster bleken vrijwel alle beesten antilichamen te produceren.

Na iedere aftap van 40 cc bloed, werd, met enkele dagen tussenpauze, i.v. geboosterd en drie weken hierna wederom afgetapt. Deze sera werden per konijn gepooled en bewaard bij -20°C .

2. Zuivering antisera

Uit de diverse gepoolde sera werd het IgG gezuiverd op dezelfde wijze als beschreven voor de zuivering van ratten IgG uit ratten serum (zie boven).

a. Anti-Fx₁A-antilichamen

De antisera tegen nierschors antigeen werden in de dubbele agar diffusie test onderzocht op de aanwezigheid van anti-Fx₁A. Die sera, waarin een goede precipitatie lijn tegen Fx₁A werd gevonden, werden gepooled, waarbij wel de sera van Witte Wener- en „boeren”konijnen gescheiden werden gehouden. Uit deze sera werd het IgG gezuiverd (zie boven). Dit IgG werd vervolgens geabsorbeerd aan oplosbaar ratten GBM in PBZ pH 7,2, gedurende 1 uur bij 37°C onder voortdurend roeren.

De verhouding IgG: ratten GBM werd zodanig gekozen, dat per 10 mg IgG, ratten GBM van twee niet geperfundeerde nieren werd toegevoegd.

Na absorptie werd gedurende 10 min. bij 3100 rpm gecentrifugeerd. Het supernatant werd gedialyseerd tegen aquadest en droog gevroren en bewaard bij -20°C .

b. Anti-ratten complement antilichamen

Het IgG, verkregen uit de sera van konijnen, die waren geïmmuniseerd met BSA-anti BSA complex, waaraan ratten C' was gebonden, werd geabsorbeerd aan BSA-anti BSA complexen, waaraan geen C' was gebonden. Dit met de bedoeling die antilichamen te verwijderen, die waren gericht tegen het BSA-anti BSA complex.

Het aldus verkregen antilichaam, liet één precipitatie lijn tegen ratten C' zien in een immuno-elektroforese (zie foto 3).

c. Anti-konijnen IgG antilichamen

Anti-konijnen IgG antilichamen werden direkt betrokken van de Firma Nordic (Tilburg). Gebruik werd gemaakt van geiten anti konijnen IgG.

Ook het met fluoresceïne isothiocyanaat geconjugeerde geiten anti konijnen IgG werd direkt van de Firma Nordic betrokken.

3. Bepaling Kidney-Fixing Antibody titer (KFA-t)

Ter bepaling van de titer van het zich aan de ratten GBM hechtende antilichaam, van het opgewekte konijnen anti ratten GBM, werd gebruik gemaakt van de J-131 labeling van het konijnen anti ratten GBM-IgG, zoals beschreven door VAN Es (39).

De labeling van het konijnen anti ratten GBM geschiedde in het Isotopen Laboratorium van de RU-Groningen.

Het gelabelde konijnen anti ratten GBM werd intraperitoneaal (i.p.) bij ratten ingespoten, waarbij een deel als ijk vloeistof werd bewaard. 24 uur na i.p. toediening werd 5 cc bloed uit de aorta opgezogen, waarna de beesten met 0,9 % NaCl werden geperfundeed, teneinde al het bloed uit de organen te verwijderen. Hierna werd de radioactiviteit in longen, milt, lever, nieren en in het bloed gemeten. De KFA-t kon daarna berekend worden volgens de volgende formule:

$$\text{KFA-t} = \frac{\text{CPM in nieren}}{\text{CPM i.p. ingespoten}}$$

Indien de waarden van een duplo bepaling zeer dicht bij elkaar lagen, werd als maatstaf het gemiddelde van de twee titers aangenomen. Indien de tellingen te ver uiteen lagen, hetgeen één keer gebeurde, werd de bepaling over gedaan.

Uitgaande van de gegevens van UNANUE (122) en VAN Es (39), werd als dosis voor een nefrotoxische glomerulonefritis aangehouden die dosis IgG, die 240 gamma kidney fixing antibody bevat.

De toe te dienen hoeveelheid IgG kon berekend worden volgens de formule:

$$\text{dosis IgG} = \frac{240}{\text{KFA-t}} \times \text{gamma}$$

D. EIWITBEPALING IN DE URINE

Van alle ratten werd twee maal per week de 24 uren eiwit uitscheiding in de urine bepaald, te beginnen 1 week voor het starten van de proef. Hiertoe werden de ratten, separaat, gedurende 24 uur in een stofwisselingskooi geplaatst. Vast voedsel werd hen gedurende de verzamelperiode onthouden. Wel werd ad libitum water gegeven. Aangezien bij het drinken vaak door de beesten werd gemorst, werd de 24 uren eiwit uitscheiding berekend in mg/24 uur.

Het eiwit gehalte in de urine werd bepaald volgens de Biureet methode. De fotometrisch gevonden extinctie werd omgerekend door middel van een ijk-lijn, die werd gemaakt aan de hand van verschillende concentraties BSA-oplossingen, getest met een standaard serum van het RIV-Utrecht. Voor het gebruik van een nieuwe Biureet oplossing werd steeds een nieuwe ijk-lijn vervaardigd.

E. LICHT MICROSCOPIE

Voor licht microscopie werden dwarsdoorsneden midden uit de nier, van ± 2 mm dik gefixeerd in Tellyesniczsky oplossing. Na fixatie en ontwatering in oplopende concentraties alcohol, werden de weefselstukjes ingebed in paraplax. (Firma Amstelslad, Amsterdam). 2 μ dikke coupes werden als routine gekleurd met Periodic Acid Schiff (PAS) en Methenamine Zilver volgens JONES (MZ).

F. FLUORESCENTIE MICROSCOPIE

Bij immunofluorescentie werd steeds gebruik gemaakt van de direkte methode. De gebruikte sera, gericht tegen ratten IgG, ratten C' en ratten Fx₁A, werden geconjugeerd aan fluoresceïne isothiocyanaat volgens THE (118). Het fluoresceïne gelabelde geiten anti konijnen IgG werd, zoals boven vermeld, betrokken van Nordic (Tilburg).

Voor fluorescentie onderzoek werden kleine stukjes nierschors direkt na het uitnemen van de nier snel ingevroren met behulp van koolzuur. Vervolgens werden 2 μ dikke cryostaatcoupes gesneden op een Spencer microtoom, bij -20°C .

De coupes werden ontdooid en door föhnen aan het objekt glas gehecht. Hierna werden de coupes gespoeld (45-60 min.) in PBZ pH 7,2 bij 37°C en met conjugaat geïncubeerd bij 37°C gedurende 30 min. Hierna werd weer gespoeld in PBZ pH 7,2 bij 37°C gedurende 45 min. De coupes werden ingesloten in gebufferde glycerine pH 8,4 en het dekglas werd vervolgens vastgehecht met een paraffine rand.

De coupes werden beoordeeld in een Leitz-fluorescentie microscoop met epi-illuminatie volgens PLOEM.

In gevallen waarin het antigene bestanddeel van de afgezette immuuncomplexen aangetoond moest worden, werden de coupes gedurende 18 uur bij 37°C gespoeld in een 0,02 M citraat buffer pH 3,2, teneinde een dissociatie te bewerkstelligen tussen antigeen en antilichaam, waarna het antigeen met behulp van immunofluorescentie kon worden aangetoond.

G. ELEKTRONEN MICROSCOPIE

Voor elektronen microscopie werden direkt na uitnemen van de nier, zeer kleine brokjes nierschors (1 mm^3) gefixeerd gedurende 1 uur bij kamer temperatuur in fosfaat gebufferde Formaldehyde-Glutaaraldehyde (2 % Glutaaraldehyde in een 2 % Formaldehyde oplossing pH 7,2—7,4 (FG), volgens een eigen modificatie van het voorschrift van KARNOVSKY (61).

Hierna werden de gefixeerde stukjes bij 4°C gedurende 16 uur gespoeld in Trismaleïnezuur buffer pH 7,3 en vervolgens na-gefixeerd in 2 % fosfaat gebufferde OsO_4 pH 7,35, gedurende 2 uur bij 4°C . Na spoelen in NaCl 0,9 %, werd het materiaal ontwaterd in alcohol en ingebed in EPON 812.

Ultra dunne coupes van 500-600 Å werden met een glas mes gesneden op een LKB ultratoom.

Contrastering geschiedde met 5 % Uranylacetaat (45 min. kamer temp.) en Loodcitraat (2 min. kamer temp.).

De coupes werden bekeken in een Philips-EM 300.

H. IMMUNO-ELEKTRONEN MICROSCOPIE

Voor immuno-elektronen microscopie werd gebruik gemaakt van de „super sandwich” peroxidase techniek (HOEDEMAEKER 59).

Hiertoe werden de te onderzoeken nieren in situ gedurende korte tijd geperfundeerd met NaCl 0,9 %, totdat de nier bloed leeg was (na ± 45 sec.), waarna aansluitend gedurende 3 min. werd geperfundeerd met FG. Hierna werd opnieuw met NaCl 0,9 % geperfundeerd om het achtergebleven fixatief te verwijderen.

Drie mm^3 brokjes van de aldus geprepareerde nierschors werden daarna gespoeld in Trismaleïnezuur buffer pH 7,3, gedurende 24 uur bij 4°C . Vervolgens werden de weefselstukjes in een gelatine capsule gevuld met „tissuetek” bevroren in Freon-12 van -100°C .

$20\text{ }\mu$ dikke cryostaatcoupes werden opgevangen en enkele keren gespoeld in een puntbuis met PBZ pH 7,2. In deze zelfde buis werden de coupes geïncubeerd met achtereenvolgens:

Geiten anti konijnen IgG 1 : 16

Konijnen anti peroxydase 1,25 mg IgG/ml

Peroxydase 0,0375 mg/ml

Alle incubaties geschieden gedurende 30 min. bij kamertemperatuur. Na iedere incubatie werd 30 min. gespoeld in PBZ pH 7,2 eveneens bij kamertemperatuur.

Het enzym peroxydase werd zichtbaar gemaakt met een 75 mg % oplossing van Diaminobenzidine tetrahydrochloride waaraan 0,001 % H_2O_2 was toegevoegd. De duur van deze reactie was afhankelijk van het zichtbaar worden van het bruine reactie produkt in het prepareermicroscop, waaronder de reactie plaats vond. De reactie werd gestopt door spoelen in PBZ pH 7,3. Werd het reactie produkt niet zichtbaar, dan werd de reactie na 20 min. gestopt.

Hierna werden de aldus bewerkte coupes nagefixeerd in 2 % fosfaat gebufferde OsO_4 pH 7,35, gedurende 45 min. bij 20°C , ontwaterd en ingebed in EPON-ARALDITE mengsel (EPON 812, 10 gr; ARALDITE M, 5,7 gr). Verder

werd het materiaal bewerkt als de routine elektronen microscopie, echter werden de dunne coupes niet nagecontrasteerd.

J. GENEESMIDDELEN

Het effect op de EGN van een viertal geneesmiddelen, die in de menselijke nierpathologie veel worden gebruikt, werd onderzocht, n.l.:

Prednison-Na-succinaat (Prednison)

Azathioprine (Imuran)

Cyclofosfamide (Endoxan)

Indomethacine (Indocid)

Hiervoor werden drie groepen onderscheiden:

- a. een groep die het geneesmiddel vanaf vier dagen vóór het opwekken van de EGN kreeg toegediend.
- b. een groep die het geneesmiddel kreeg vanaf het moment waarop de EGN werd opgewekt.
- c. een groep die het geneesmiddel kreeg vanaf tien dagen na het opwekken van de EGN.

De geneesmiddelen Prednison, Imuran en Endoxan werden i.p. gegeven.

Het Indocid werd subcutaan (s.c.) gegeven.

Aangezien antisera voor het opwekken van EGN ook i.p. werden toegediend, was tevoren, met behulp van radioactief gemerkt gamma globuline, vastgesteld, dat de genoemde geneesmiddelen geen nadelig effect op de resorptie van het toegediende gamma globuline hadden.

Prednison

Prednison, opgelost in NaCl 0,9 ‰, werd gegeven in een dosis 0,6 mg/kg.

Imuran

Imuran werd gegeven in een dosis van 5 mg/kg, eveneens opgelost in NaCl 0,9 ‰.

Endoxan

Endoxan werd eerst gegeven in een dosis van 5 mg/kg. Bij deze dosis trad echter een sterfte op van meer dan 50 ‰. De beesten toonden een volledige beenmerg depressie, terwijl ook cerebrale- en ruggemergsbloedingen werden gevonden.

Derhalve werd de proef herhaald met een dosis van 3 mg/kg. Ook Endoxan werd opgelost in 0,9 ‰ NaCl.

Indocid

Indocid werd gegeven in een dosis van 4 mg/kg. Het Indocid werd opgelost in NaHCO₃ 1,4 ‰, onder verwarming tot 30°C (volgens DAHA, pers. mededeling).

GEKOZEN EGN MODELLEN

Nefrotoxische glomerulonefritis

Nefrotoxische glomerulonefritis werd opgewekt met behulp van konijnen anti ratten GBM, dat i.p. werd toegediend in een dosis, die tenminste 240 gamma KFA bevatte. Bij deze dosis kan een maximaal effect van het toegediende antilichaam in de glomeruli worden verwacht (UNANUE 122, VAN ES 39).

Het aldus aangeboden konijnen anti ratten GBM bleek zich bij bestudering met immunofluorescentie, direct na toediening in een lineair patroon te hebben gehecht aan de GBM (foto 1). Immuno elektronen microscopie toonde aan, dat het ingespoten antilichaam zich over de gehele breedte van de GBM had gebonden (foto 4). Alleen het filtrerende (niet mesangiale) gedeelte van de GBM bevatte het ingespoten antilichaam.

In andere organen van het ingespoten proefdier of de rest van het nierweefsel van de rat, werd geen binding van het ingespoten antilichaam aangetoond.

Helaas bleek, dat ruim 75 % van de ingespoten ratten binnen 12 uur na toediening van het anti GBM antilichaam stierven tengevolge van een uitgebreide intravasale stolling, die uitsluitend in de nieren werd waargenomen. Tengevolge van deze stolling werd een meer of minder ernstige nierschorsnecrose gezien, gepaard gaande met een macroscopische haematurie. Ook bij de ratten, die in leven bleven na het toedienen van het anti GBM antilichaam, werd een intravasale stolling in de glomeruli van de nier gezien, zij het in mindere mate. In beide gevallen echter was de stolling zo ernstig, dat zij eventuele veranderingen in de glomeruli tengevolge van de nefrotoxische glomerulonefritis, zoals de beschreven leucocytaire invasie en proliferatie van endotheel (COCHRANE 27, UNANUE 121 t/m 126) geheel overschaduwde. Wel werd een proteinurie aangetoond.

Genoemde intra-vasale stolling kon worden voorkomen, door de ratten vanaf het moment van toedienen van het anti GBM antilichaam, heparine te geven in een dosis van 300 I.E./6 uur. In deze gevallen bleven alle ratten in leven, maar trad geen proteinurie meer op terwijl bij histologisch onderzoek geen afwijkingen in de glomeruli konden worden aangetoond. De lineaire hechting van het ingespoten antilichaam aan de GBM bleef onveranderd, evenals de complement binding.

De intravasale stolling kon niet worden voorkomen door uitgebreide absorptie van het anti serum aan serum eiwitten of aan weefsel poeders van de rat, ter verwijdering van eventueel bij de immunisatie ontstane antilichamen tegen serum eiwitten, endotheel cellen of cellulaire bloedbestanddelen. Ook bleek de stolling niet te berusten op de aanwezigheid van endotoxine in het antiserum, aangezien na inactivatie hiervan de stolling even duidelijk optrad. De mogelijkheid, dat het IgG van de Witte Wener konijnen op zich de intravasale stolling veroorzaakte kon worden uitgesloten, doordat bleek, dat normaal IgG van de

Witte Wener konijnen na inspuiting bij de rat geen afwijkingen in de glomeruli veroorzaakte.

Om deze redenen moeten we rekening houden met het feit dat de intravasale stolling een integraal onderdeel vormt van de nefrotoxische glomerulonefritis. Deze gedachte wordt gesteund door het feit, dat ook anderen (VASSALLI 127, 128; UNANUE 122, 126; MIHARA 93^A) melding maken van het optreden van intra-vasale stolling bij nefrotoxische glomerulonefritis, zij het in mindere mate. Bovendien vermeldt UNANUE (126) dat verhogen van de dosis nefrotoxisch antiserum een verhoogde kans op het ontstaan van intra-vasale stolling geeft.

Het is reeds lang bekend, dat er verband is tussen een immunologische reactie en het optreden van intra-vasale stolling. Antigeen-antilichaam complexen kunnen via destructie van bloedplaatjes (HOROWITZ, 60) of zonder dat er bloedplaatjes aan te pas komen (BECKER, 13) intra-vasale stolling veroorzaken.

Het mechanisme voor het initiëren van het stollings proces bij nefrotoxische glomerulonefritis zou anders zijn, daar er hier geen sprake is van circulerende antigeen-antilichaam complexen. In dit model zou door de antigeen-antilichaam reactie in de glomerulus het endotheel beschadigd worden, mogelijk door complement binding (RATNOFF, 100), waarna intra-vasale stolling optreedt.

Hierbij is het vermeldenswaard, dat bij de humane vorm van anti basaalmembraan glomerulonefritis uitgebreide deposities van fibrine in de glomeruli worden aangetroffen.

De reden, dat niet bij elke nefrotoxische glomerulonefritis uitgebreide stolling kan worden aangetroffen, ligt waarschijnlijk in het feit, dat bij de immunisatie procedure in het konijn, meerdere types IgG worden gevormd, met of zonder complement bindende activiteit en daardoor verschillend effect (HENSON 56). In ons model staat blijkbaar het type IgG, dat endotheel beschadiging geeft met een intraglomerulaire stolling als gevolg, op de voorgrond. Bij andere onderzoekers is dit type wel aanwezig, maar in mindere mate, zodat de stolling hier geen dominerende rol speelt.

Ook hieruit blijkt weer dat het moeilijk is van één vorm van experimentele glomerulonefritis te spreken, zelfs als het pathogenetische mechanisme hetzelfde is.

In de praktijk leverde de optredende stolling ernstige problemen op bij het bestuderen van de natural history van dit type glomerulonefritis, terwijl het vrijwel onmogelijk was de invloed van geneesmiddelen op het beloop te bestuderen. Vanwege deze reden werd besloten deze vorm van experimentele glomerulonefritis niet verder in het onderzoek te betrekken.

Complex glomerulonefritis

De hier gebruikte vorm van complex glomerulonefritis is bijzonder, aangezien toediening van heterologe antilichamen, gericht tegen autologe antigenen een complex glomerulonefritis tot gevolg heeft. Voor het opwekken van deze complex glomerulonefritis werd gebruik gemaakt van konijnen anti Fx₁A antilichamen, die i.p. werden toegediend in een éénmalige dosis van 10 mg.

Na toediening bleek dit konijnen anti-Fx₁A-IgG reeds na 6 uur aantoonbaar

te zijn met behulp van de immunofluorescentie in een granulair patroon langs de GBM. Deze afzetting was eerst gering, doch werd de volgende dagen sterker en bereikte na ± 10 tot 14 dagen zijn hoogtepunt (foto 2), terwijl deze afzetting na 7 maanden nog steeds aantoonbaar blijft. De granulaire afzetting van konijnen anti Fx₁A wordt diffuus door de glomeruli waargenomen. Tubulaire of interstitiele structuren blijven negatief. Na 2 dagen kan naast de afzetting van konijnen anti Fx₁A ook een zwakke binding van complement worden waargenomen, in eenzelfde, granulair, patroon als het konijnen anti Fx₁A.

Na ± 10 dagen wanneer de autologe fase optreedt, wordt naast de afzetting van konijnen anti Fx₁A en complement ook afzetting van ratten IgG waargenomen, eveneens in een granulair patroon. Deze afzetting wordt de volgende dagen iets duidelijker, totdat ze na 3 tot 4 weken het maximum bereikt (foto 5).

Een dergelijke granulaire afzetting van immuunglobulinen en van het ingespoten konijnen anti Fx₁A, duidt op een afzetting van immuuncomplexen in de glomeruli, waarvan het konijnen anti Fx₁A en vanaf 10 dagen het ratten IgG deel uitmaken.

Om na te gaan welk antigeen eventueel deel uitmaakte van een dergelijk immuuncomplex, werden elutie studies uitgevoerd, zoals beschreven in materiaal en methoden. Met behulp van aan fluoresceïne isothiocyanaat gekoppeld konijnen anti Fx₁A waren we, na elutie, in staat een immunofluorescentie beeld in de glomeruli te verkrijgen, dat hoewel veel zwakker een vrijwel identieke granulaire fluorescentie toonde zoals gezien werd bij fluorescentie van het afgezette konijnen IgG, C' en ratten IgG (foto 6). Het toegediende konijnen anti Fx₁A reageert kennelijk met het Fx₁A, op een zodanige wijze dat immuuncomplexen worden gevormd, die worden afgezet langs de GBM. Deze veronderstelling lijkt logisch, gezien het feit dat EDINGTON (35) en GLASSOCK (49) aantoonde, dat het Fx₁A normaliter, zij het in zeer geringe hoeveelheden, in het bloed circuleert. Het in tweede instantie afgezette ratten IgG, zal gericht zijn tegen in de GBM afgezette heterologe antilichamen (zie hoofdstuk VII).

De hoeveelheid van 10 mg IgG om de glomerulonefritis op te wekken werd gekozen om een duidelijke, doch niet overvloedige afzetting van immuuncomplexen in en langs de GBM te verkrijgen, waardoor een eventueel effect op deze afzettingen door diverse geneesmiddelen duidelijk zal blijven.

Deze geringe hoeveelheid IgG heeft na inspuiten bij de meeste dieren een lichte proteinurie tot gevolg. Enkele batches („boeren” konijn) echter toonden geen proteinurie. De dosis werd hier niet verhoogd, aangezien het belangrijker was de groepen onderling te kunnen blijven vergelijken met betrekking tot de hoeveelheid ingespoten IgG, terwijl het tevens belangrijker leek het effect van geneesmiddelen te bestuderen op de afzetting van immuuncomplexen, dan op één van de gevolgen hiervan (proteinurie).

Bij de bestudering van deze complex glomerulonefritis hebben we gebruik gemaakt van twee proefopstellingen:

I. een proef ter bestudering van het „natuurlijke” beloop (de natural history, NH) en het effect van Prednison en Imuran. Hierbij werd gebruik gemaakt van konijnen anti Fx₁A, opgewekt in Witte Wener konijnen. Alle ratten ontvingen 10 mg konijnen anti Fx₁A, opgelost in een $\frac{1}{2}$ cc NaCl 0,9 % i.p..

Hier werd uitgegaan van 20 ratten per te onderzoeken groep. Hiernaast werden

3 × 20 ratten als controle toegevoegd, die resp. alleen een $\frac{1}{2}$ cc NaCl 0,9 % i.p. kregen, een groep die daarnaast dagelijks ook prednison kreeg en een groep die imuran kreeg. Deze ratten kregen geen (normaal) konijnen IgG als controle. Pilot studies hadden n.l. aangetoond, dat geen afzettingen van immuun complexen of andere afwijkingen optraden na inspuiten van het normale konijnen IgG, terwijl wij een eventuele reactie van het geneesmiddel op de nier alleen niet wilden laten overdekken door een mogelijke autologe fase van de rat tegen het heterologe IgG.

Iedere groep van 20 ratten werd onderverdeeld in groepen van 5 ratten, die resp. werden afgemaakt 10-, 14-, 30- en 90 dagen na toediening van het konijnen anti Fx₁A.

De ratten waarbij het prednison en imuran werd gestart 10 dagen na toediening van het konijnen anti Fx₁A volgden een iets ander schema. Immers hier had het afmaken na 10 dagen geen zin. Derhalve werd hier een groep ingelast die na 21 dagen werd afgemaakt in plaats van na 10 dagen.

Alle ratten ondergingen 2 dagen na toediening van het konijnen anti Fx₁A rechtszijdige nefrectomie via een incisie in de rug. Dit had ten doel van alle beesten een uitgangbeeld te krijgen, ter vergelijking met latere stadia van de ziekte, terwijl het tevens diende als controle ter vaststelling of inderdaad afzetting van immuuncomplexen was opgetreden. Dit bleek in 100 % het geval te zijn. Ook de controledieren ondergingen nefrectomie.

II. Een proef ter bestudering van het effect van Endoxan en Indocid.

Hier werd gebruik gemaakt van konijnen anti Fx₁A, opgewekt bij „boeren” konijnen. De batch konijnen anti Fx₁A, verkregen bij Witte Wener konijnen was n.l. na de eerste proef niet meer voldoende om alle beesten van proef II te kunnen voorzien van 10 mg konijnen anti Fx₁A. Ter controle werd daarom naast de geneesmiddelen groepen weer opnieuw een NH ingezet van ratten die konijnen anti Fx₁A van „boeren” konijnen kregen.

De beesten kregen wederom 10 mg konijnen anti Fx₁A in een $\frac{1}{2}$ cc NaCl 0,9 % i.p.

Gezien de ervaringen met de beesten uit proef I, werden bij deze proef geen groepen afgemaakt na 10-, 14- en 30 dagen. Per groep werden hier steeds 7 in plaats van 5 beesten ingezet, die gedurende 90 dagen vervolgd werden. Dit werd gedaan om eventuele intercurrente sterfte die bij deze geneesmiddelen optrad, op te kunnen vangen. Indien deze sterfte niet optrad werden de 2 extra beesten gebruikt ter bestudering van het beeld na 30 dagen.

Controlebeesten werden ingezet, die, zoals beschreven bij de groepen ter bestudering van de effecten van imuran en prednison, alleen naast 0,9 % NaCl, dagelijks i.p. endoxan of indocid kregen.

Ook hier werd bij alle dieren na 2 dagen nefrectomie verricht.

RESULTATEN

In de eerste plaats zullen de resultaten van het natuurlijke beloop van de opgewekte glomerulonefritis worden vermeld, waarbij steeds de morfologische afwijkingen worden vergeleken met die van de controle dieren, die met NaCl 0,9 % werden ingespoten. Dit zal achtereenvolgens gebeuren voor de complex glomerulonefritis opgewekt met IgG van de Witte Wener konijnen, die als uitgangspunt diende voor het bestuderen van het effect van de geneesmiddelen prednison en imuran en voor de complex glomerulonefritis opgewekt met IgG van het „boeren” konijn, die als basis diende voor de bestudering van het effect van endoxan en indocid. Hierna zal het beloop van de proteinurie voor beide groepen worden vermeld.

De resultaten van het onderzoek naar het effect van geneesmiddelen zullen per geneesmiddel worden gegeven in vergelijking met de afwijkingen, die op hetzelfde moment bij de NH werden geconstateerd. Hier zal ook het proteinurie beloop per geneesmiddel worden vermeld in vergelijking met het proteinurie beloop in de NH groep.

A. „HET NATUURLIJKE” BELOOP (NH)

Twee dagen

Licht microscopie: Er is een lichte diffuse zwelling van het epitheel en van het mesangium van de glomeruli. Er is geen endotheelzwelling en de capillairen blijven fraai open. Er wordt geen infiltratie met polymorfnucleaire leucocyten en/of lymfocyten gevonden (foto 7a/b).

Immunofluorescentie: Er is een zwakke, maar onmiskenbare diffuse fijn-korrelige afzetting van konijnen IgG langs de GBM (f. 8). In dit stadium wordt nog geen afzetting van ratten IgG waargenomen. Voorts worden langs de GBM enkele afzettingen van complement aangetoond (f 9).

Elektronen microscopie: De GBM heeft een normale dikte en opbouw. De drie lagen, lamina rara interna, lamina densa en lamina rara externa, zijn in hun normale verhouding aanwezig. Het endotheel is normaal. Het epitheel lijkt, in overeenstemming met de licht microscopie iets gezwollen, evenals het mesangium. In de GBM, met name in de lamina densa, worden kleine elektronen dichte afzettingen gezien. Bovendien worden enkele elektronen dichte afzettingen waargenomen in de lamina rara externa, voornamelijk in de slit pore, tussen de epitheelvoetjes (f 10).

Tien dagen

Licht microscopie: Er zijn geen significante afwijkingen ten opzichte van de controle (f 7b).

Immunofluorescentie: Er wordt nu een sterkere afzetting van konijnen IgG langs de GBM gezien, met een iets grover karakter dan de afzetting na twee dagen (f 2). Nu wordt ook duidelijk ratten IgG aangetoond (f 5), een teken dat we te maken hebben met de autologe fase (zie Hfdst. V). De hoeveelheid afgezet ratten IgG, geschat naar het aantal fluorescerende korrels, lijkt echter nog iets achter te blijven bij de hoeveelheid afgezet konijnen IgG. De afzetting van C' is nu duidelijker geworden en de afzettingen zijn grover dan na twee dagen (f 11).

Elektronen microscopie: Het beeld is sterk gewijzigd. De afzettingen in de GBM zijn veel talrijker en groter geworden en liggen nu merendeels in de lamina rara externa, tegen het epitheel aan. Soms zijn de epitheelvoetjes boven dergelijke afzettingen gefuseerd. Ook worden nog kleinere elektronen dichte afzettingen in de slit pores gevonden (f 12), terwijl nog enkele afzettingen zichtbaar blijven in de lamina densa. Hierdoor wisselt de dikte van de GBM vrij sterk. De GBM toont vooral langs het mesangiale gebied kronkeling. Op deze plaatsen is een nauwkeurige lokalisatie van de afzettingen niet goed te geven. Er is een toename van mesangiale matrix (f 13).

Veertien dagen

Het beeld na veertien dagen is in de licht microscopie, in de immunofluorescentie microscopie en de elektronen microscopie niet te onderscheiden van hetgeen gevonden werd na tien dagen.

Dertig dagen

Licht microscopie: Het mesangium is verbreed en toont toename van PAS/zilver positief materiaal. De GBM toont geen duidelijke verdikking (f 14, f 15).

Immunofluorescentie: Het beeld is vergelijkbaar met dat van tien- en veertien dagen (f 16, f 17).

Elektronen microscopie: Grote afzettingen liggen tegen het epitheel aan in de lamina rara externa (f 18). Hier worden ook enkele kleinere afzettingen gezien, deels in de slit pore. Rond enkele grotere deposities wordt afzetting van GBM materiaal waargenomen (f 19). Soms bevindt zich ook basaalmembraan substantie tussen de afzettingen en de epitheelvoetjes, waardoor deze afzettingen naar beneden gedrukt lijken te zijn (f 20). Er wordt fusie van epitheelvoetjes gezien. Het beeld van het mesangium verschilt niet duidelijk van dat wat werd gevonden na tien- en veertien dagen.

Negentig dagen

Licht microscopie: De GBM is nu gekronkeld en onregelmatig verdikt, met name langs het mesangium. Soms zien we een z.g.n. „moth eaten” aspekt (f 24). Het mesangiale gebied is verbreed en bevat veel PAS/zilver positief materiaal. Er is een enkele atrofische tubulus, maar niet meer dan in de controle ratten van deze leeftijd werd waargenomen.

Immunofluorescentie: Het beeld is vrijwel constant gebleven. De afzettingen van het ingespoten konijnen IgG zijn nog steeds aantoonbaar, terwijl het karakter hetzelfde is gebleven, deels fijn-, deels grof korrelig (f 21). Het verschil in afzetting tussen konijnen IgG en ratten IgG is verdwenen (f 21, f 22). Het aantal afzettingen van complement lijkt vergelijkbaar met de groep van tien

dagen (f 23, f 11). Alle afzettingen blijven steeds beperkt tot de GBM. Het mesangium laat geen duidelijke fluorescentie zien.

Elektronen microscopie: De GBM toont nog steeds kronkeling, vooral langs het mesangiale gebied, terwijl hier ook verdubbeling van de GBM over korte afstand wordt gezien (f 25). De epitheelvoetjes zijn plaatselijk gefuseerd. De grote elektronen dichte afzettingen liggen deels nog tegen het epitheel aan, deels zien we nu, duidelijker dan na dertig dagen depositie van GBM substantie aan weerszijden van de afzettingen, die de indruk geven van zogenaamde „spikes” (f 26). Daarnaast wordt ook GBM substantie gevonden tussen de afzettingen en het epitheel, waardoor de afzettingen naar beneden gedrukt lijken te zijn (f 27, f 28). Meer dan na dertig dagen worden afzettingen midden in de GBM waargenomen (f 28, f 29). Het mesangium toont dezelfde afwijkingen als na dertig dagen.

Door middel van de immuno-elektronen microscopie kon worden aangetoond dat de elektronen dichte afzettingen aggregaten van immuun complexen zijn (f 26 t/m f 29).

Genoemde morfologische afwijkingen waren identiek wanneer de complex glomerulonefritis werd opgewekt met IgG afkomstig van „boeren” konijnen.

Proteinurie: Direct in aansluiting aan de intra-peritoneale toediening van het konijnen IgG, afkomstig van de immunisatie van de Witte Wener konijnen, werd een geringe proteinurie waargenomen tot een waarde van 5 mg/24 uur. Deze proteinurie verdween kort daarna, om na tien dagen weer te stijgen. Gedurende de eerste dertig dagen steeg de proteinurie niet boven de 10 mg/24 uur. Na dertig dagen trad een verdere stijging van de proteinurie op, waarbij een sterke wisseling in de hoogte van de proteinurie op de verschillende dagen werd waargenomen. Vanwege deze grote verschillen werd bij het uitzetten van deze grafiek niet uitgegaan van het gemiddelde van de proteinurie van de vijf beesten, die de negentig dagen werden vervolgd, doch van de middelste waarde. (grafiek I pg. 72).

Werd de complex glomerulonefritis opgewekt met IgG verkregen door immunisatie van „boeren” konijnen, dan werd, evenals met het IgG van de Witte Wener konijnen, een initiële uitscheiding van eiwit in de urine waargenomen, in aansluiting aan de toediening van het heterologe IgG. Hierna was bij deze groep de proteinurie echter niet te onderscheiden van de controle beesten, die alleen NaCl 0,9 % kregen toegediend.

B. HET EFFEKT VAN GENEESMIDDELEN

I. Het effect van prednison-vooraf

Twee dagen

Na twee dagen worden in de licht-, immunofluorescentie- en elektronenmicroscopie geen verschillen waargenomen in vergelijking tot de NH.

Tien dagen

De licht-, immunofluorescentie- en elektronenmicroscopie toonden geen verschillen met de NH.

Veertien dagen

De waarnemingen na veertien dagen verschillen niet van die van tien dagen.

Dertig dagen

Ook nu tonen zowel de licht-, immunofluorescentie als elektronenmicroscopie geen verschil ten opzichte van de NH. Foto 30 toont de kronkeling van de GBM met afzettingen in de matrix van het mesangium.

Negentig dagen

Ook nu weer verschilt het beeld in de licht-, fluorescentie- en elektronen microscopie niet van dat van de NH.

Proteinurie: Het proteinurie beloop in de groep, die prednison kreeg toegediend vier dagen voor het opwekken van de complex glomerulonefritis, toont geen significante verschillen t.o.v. de NH. De grafieken overdekken elkaar vrijwel geheel, alhoewel in de periode tussen veertien- en eenentwintig dagen de proteinurie iets achter lijkt te lopen. Een significant verschil was hier niet aantoonbaar (grafiek II pg. 73). De grafiek wordt hier tevens vergeleken met de controle groep die dagelijks prednison kreeg toegediend. (Deze laatste grafiek verschilt niet van de controle beesten die NaCl 0,9 % kregen, zonder geneesmiddelen).

II. Het effect van prednison-gelijk

In deze groep zullen de licht- en fluorescentie microscopische bevindingen niet ter sprake komen, daar deze geen verschil tonen t.o.v. de NH.

Twee dagen

In de elektronen microscopie kregen we de indruk dat er iets meer immuun-complex aggregaten in de lamina rara externa lagen, waarbij deze aggregaten vaak nog verbinding hadden met de lamina densa. Daarnaast worden ook nog geheel in de lamina densa gelegen complex aggregaten aangetoond (f 31).

Tien dagen

In vergelijking tot het elektronen microscopische beeld in de NH, worden hier iets meer immuuncomplex aggregaten in de lamina densa aangetroffen.

Veertien dagen

Evenals in de groep afgemaakt na tien dagen worden hier nog immuuncomplex aggregaten in de lamina aangetroffen (f 32).

Dertig dagen

Ook in de dertig dagen groep worden nog immuuncomplex aggregaten in de lamina densa aangetroffen. Naast grotere aggregaten, worden ook nog vrij veel kleinere aggregaten gezien (f 33). Veel verschil met de natural history is er niet meer.

Negentig dagen

De negentig dagen groep lijkt geheel op de NH. Meerdere grote immuuncomplex

aggregaten liggen in de lamina rara externa, deels ingesloten in de GBM, terwijl ook, met name in de immuno-elektronen microscopie, fraai de spikevorming langs de complex aggregaten gezien kan worden (f 34, f 35).

Proteinurie: Het proteinurie beloop in de groep die prednison tegelijk met het opwekken van de complex glomerulonefritis kreeg toegediend, toont geen verschil ten opzichte van de NH. Beschouwen we dit proteinurie beloop in de grafiek (grafiek III pg. 74), dan blijkt deze geheel te worden overdekt door die van de NH.

III. Het effect van prednison na tien dagen

Bij de beschrijving van deze groep kunnen licht- en immunofluorescentie microscopie achterwege blijven, daar deze identiek waren met de NH.

Twee dagen

Gezien het feit dat hier eerst na tien dagen met het geven van prednison werd begonnen, was het beeld na twee dagen uiteraard gelijk aan dat van de NH.

De overige groepen (de hierin gevoegde groep die werd afgemaakt na eenentwintig dagen, kon niet ten opzichte van de NH worden vergeleken, doch deze groep toonde ten opzichte van de groep van veertien dagen geen verschil), veertien-, dertig- en negentig dagen, tonen geen verschil met de NH. Foto 36 toont een fraai voorbeeld uit de immuno-elektronenmicroscopie waarop de afzetting van GBM tussen epitheel en immuuncomplex aggregaat te zien is.

Proteinurie: Het proteinurie beloop van deze groep toont nauwelijks verschillen ten opzichte van de NH. Wel loopt de grafiek (grafiek IV pg. 75) steeds langs de ondergrens van de grafiek van de NH. Het proteinurie beloop lijkt iets te zijn afgevlakt. In het beloop van de eiwituitscheiding kan twee maal een significant verschil ($p < 0,05$, naar WILCOXON) ten opzichte van de NH gevonden worden, namelijk na $1\frac{1}{2}$ maand en de laatst gemeten waarde na 3 maanden.

IV. Het effect van imuran-vooraf

Bij de histologische beschouwingen kan, evenals in de prednison groepen, de licht microscopie achterwege gelaten worden, aangezien die niet verschilde van de NH.

Twee dagen

Immunofluorescentie: Ten opzichte van de NH zijn geen verschillen waarneembaar.

Elektronen microscopie: Het mesangium is duidelijk gezwollen. In de lamina densa zijn wat kleine immuuncomplex aggregaten zichtbaar. Echter ook in de lamina rara interna kunnen we hier, met name langs het mesangiale gebied enkele kleine immuuncomplex aggregaten zien, iets wat in de NH niet werd waargenomen (f 37). Daarnaast zien we evenals in de NH kleine aggregaten in de lamina rara externa.

Tien dagen

Immunofluorescentie: Na tien dagen lijken minder afzettingen van konijnen IgG aanwezig te zijn vergeleken met de NH (f 38), terwijl de afzetting van ratten IgG niet achter blijft.

Elektronen microscopie: De GBM is minder verdikt dan bij de NH, terwijl de normale gelaagde bouw zichtbaar blijft. In de lamina rara externa zien we immuuncomplex aggregaten liggen, die in grootte duidelijk achterblijven bij die van de NH op hetzelfde moment (f 39). Langs het mesangium blijft ook hier de GBM onregelmatig. De immuuncomplex aggregaten zijn hier niet goed te lokaliseren in een bepaalde laag van de GBM. Tevens blijkt dat het mesangium zich tussen endotheel en GBM uitstrekt, z.g.n. interpositie, zoals o.a. te zien is op foto 46.

Veertien dagen

Immunofluorescentie: In de fluorescentie microscopie is geen verschil meer aantoonbaar ten opzichte van NH.

Elektronen microscopie: Het verschil ten opzichte van de NH, zoals dat na tien dagen werd gevonden, is ook nu nog aanwezig.

Dertig dagen

Immunofluorescentie: Het beeld is gelijk aan dat van de NH.

Elektronen microscopie: De perifere GBM lissen zijn minder afwijkend dan in de NH. De GBM is niet verdikt, terwijl slechts matige kronkeling waarneembaar is. In de lamina rara externa worden enkele kleine immuuncomplex aggregaten op de grens lamina densa/lamina rara interna aangetoond (f 40). Het mesangium toont interpositie.

Negentig dagen

Immunofluorescentie: De immunofluorescentie na negentig dagen laat geen verschil zien met de NH (f 41, f 42).

Elektronen microscopie: De GBM is minder verdikt dan in de NH. Er worden nog steeds kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina densa aangetroffen (f 43), waarboven de epitheelvoetjes niet gefuseerd zijn. Daarnaast worden soms kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa aangetroffen, waarbij dan de GBM aan de epitheliale zijde onregelmatig is en soms spike vorming toont. Ook worden hier en daar enkele grotere aggregaten in de lamina rara externa aangetoond, hetgeen met name fraai naar voren komt in de immuno-elektronen microscopie (f 44). Ook lijken hier immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna te liggen, soms zelfs in het mesangium (f 45). Het totale beeld, vooral wat het mesangium betreft, lijkt veel rustiger dan in de NH, maar er is ook hier interpositie (f 46).

Proteinurie: Bekijken we het proteinurie beloop van de beesten, die vier dagen voor het opwekken van de complex glomerulonefritis reeds werden behandeld met imuran, dan zien we dat de proteinurie van deze groep gelijk is aan de proteinurie van de groep, die naast nefrectomie slechts dagelijks imuran toegediend kregen. Steeds is er een significant ($p < 0,05$, WILCOXON) verschil met de proteinurie van de NH groep (grafiek V pg. 76).

V. Het effect van imuran-gelijk

In het verslag van de histologie van deze groep kan de licht microscopie weer vervallen, daar deze op geen enkel tijdstip verschilde van de NH.

Twee dagen

Immunofluorescentie: De beelden verschilden niet van die van de NH.

Elektronen microscopie: De elektronen microscopie toont enkele kleine immuun-complex aggregaten in de lamina rara interna, met name in de aan het mesangium grenzende gedeelten. Het merendeel der aggregaten ligt in de lamina densa, terwijl sporadisch een afzetting in de lamina rara externa wordt aangetoond.

Tien dagen

Immunofluorescentie: In de fluorescentie microscopie zien we in de glomeruli een wisselende afzetting van konijnen IgG en ratten IgG. Enkele glomeruli lijken evenveel fluorescerende granulae te bevatten als in de vergelijkbare groep van de NH, enkele glomeruli bevatten minder granulae. De afzetting van complement verschilt niet van die van de NH.

Elektronen microscopie: We zien over het algemeen kleinere immuun-complex aggregaten in de lamina densa en enkele kleine aggregaten in de lamina rara externa. Sporadisch wordt een zeer groot immuuncomplex aggregaat in de lamina rara externa aangetoond (f 47). Langs het mesangium is de GBM onregelmatig. Ook wordt mesangiale interpositie gevonden. De hoeveelheid mesangiale matrix is hier, evenals in de imuran-vooraf groep, minder toegenomen dan in de NH.

Veertien dagen

Immunofluorescentie: Het fluorescentie beeld is hier geheel gelijk aan dat van de NH. Het wisselende aantal fluorescerende granulae in de verschillende glomeruli, zoals na tien dagen werd gezien, is hier niet meer waarneembaar.

Elektronen microscopie: Het elektronen microscopische beeld toont ten opzichte van de NH dezelfde verschillen als bij de tien dagen groep.

Dertig dagen

Immunofluorescentie: Het beeld is geheel gelijk aan dat van de NH na dertig dagen.

Elektronen microscopie: Het elektronen microscopische beeld toont minder verdikte perifere GBM lissen, waar, evenals in de imuran-vooraf groep, kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa liggen. Ook worden kleine aggregaten in de lamina densa en op de grens lamina densa/lamina rara externa aangetoond. Het mesangium laat een toename van mesangiale matrix zien. Plaatselijk wordt interpositie van het mesangium waargenomen. In deze gebieden liggen voornamelijk iets grotere immuuncomplex aggregaten subepitheliaal, doch er zijn tevens aggregaten die midden in de GBM of zelfs subendotheliaal, en/of tegen het mesangium aan liggen (f 48). Lokaal wordt spike vorming gezien.

Negentig dagen

Immunofluorescentie: Het beeld is niet te onderscheiden van de NH.

Elektronen microscopie: De GBM is, als gevolg van de afzetting van grote immuuncomplex aggregaten onregelmatig van dikte. Wel blijven de immuuncomplex aggregaten in grootte vrijwel alle achter bij die in de NH-groep. De aggregaten liggen deels subepitheliaal, deels ook geheel in de GBM (f 49).

Proteinurie: De grafiek van het proteinurie beloop van de imuran-gelijk groep (grafiek VI pg. 77), toont een duidelijk verschil ten opzichte van de NH. De proteinurie in deze groep is duidelijk lager dan die van de NH. Gedurende de eerste twee maanden is er geen verschil tussen de proteinurie van de imuran-gelijk groep en de controle groep die naast nefrectomie alleen imuran kreeg toegediend. Na twee maanden echter stijgt de proteinurie iets sneller dan in de imuran-vooraf groep. De grafiek raakt hier de ondergrens van de grafiek van de NH tussen twee en drie maanden. Bij op twee na alle gemeten waarden wordt echter een significant verschil ten opzichte van de NH gezien ($p < 0,05$, WILCOXON).

VI. Het effect van imuran na tien dagen

In deze groep blijkt het licht microscopische beeld, zowel als het fluorescentie microscopische beeld op elk moment gelijk te zijn aan dat van de NH groep.

Twee dagen

Gezien het feit dat hier eerst na tien dagen met het geven van imuran werd begonnen, was het beeld na twee dagen uiteraard gelijk aan dat van de NH.

Veertien dagen

In de elektronen microscopie zien we vrij grote immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa. Op deze plaatsen zijn de epitheelvoetjes gefuseerd (f 50). De complex aggregaten lijken enigszins in grootte achter te blijven bij de NH. Ter plaatse van het mesangium toont de GBM een rommelig beeld en worden ook subendotheliaal liggende aggregaten aangetroffen. Interpositie van het mesangium is hier ook duidelijk (f 51).

Eén en twintig dagen

Het elektronen microscopische beeld verschilt niet duidelijk van dat wat we na veertien dagen vinden.

Dertig dagen

De elektronen microscopie toont naast normale delen van de GBM, over vrij grote gebieden een onregelmatige verdikking, met fusie van de epitheelvoetjes en grote immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa. Ook worden nog enkele complex aggregaten in de lamina densa gezien (f 52). Lokaal is hier ook spike vorming van de GBM te zien, waardoor de aggregaten worden ingesloten (f 53).

Negentig dagen

Na negentig dagen zien we een onregelmatige, licht verdikte GBM met immuun-

complex aggregaten in de lamina rara externa en fusie van de epitheelvoetjes. De immuuncomplex aggregaten zijn groot. Merendeels blijven de aggregaten subepitheliaal liggen. Duidelijke verdubbeling van de GBM wordt niet gezien, wel is hier en daar spike vorming. Op een enkele plaats is interpositie van het mesangium (f 54). In de immuno-elektronen microscopie is de grootte van de complex aggregaten goed zichtbaar te maken (f 55).

Proteinurie: Het proteinurie beloop van de imuran na tien dagen groep is identiek aan de NH. De grafieken van dit beloop overdekken elkaar geheel (grafiek VII pg. 78). Er is duidelijk een significant ($p < 0,05$, WILCOXON) verschil gedurende de gehele proef met de overige imuran groepen.

VII. Het effect van endoxan-vooraf

De licht microscopie toonde op geen enkel moment verschillen ten opzichte van de NH en zal daarom niet worden besproken.

Twee dagen

Na twee dagen worden noch in de fluorescentie microscopie noch in de elektronenmicroscopie verschillen ten opzichte van de NH gevonden.

Dertig dagen

Fluorescentie microscopie: De afzetting van konijnen IgG is identiek aan die van de NH (f 56). Ook de C' was zeker zo sterk als de NH. De afzetting van ratten IgG was mogelijk minder uitgesproken dan in de NH (f 57).

Elektronen microscopie: We zien merendeels kleine immuuncomplex aggregaten gelegen op de grens lamina densa/lamina rara externa (f 58). Daarnaast worden ook enkele grotere immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa gezien met een smalle zoom GBM materiaal tussen de afzetting en het epitheel. Enkele aggregaten lijken zich door de gehele breedte van de GBM uit te strekken (f 59). Het mesangium is niet gezwollen.

Negentig dagen

Fluorescentie microscopie: De afzetting van konijnen IgG is gelijk aan de NH, evenals de afzetting van C'. De afzetting van ratten IgG echter blijft evenals in de groep afgemaakt na dertig dagen achter ten opzichte van de NH.

Elektronen microscopie: De elektronen microscopie toont een iets onregelmatige GBM, met vooral kleine immuuncomplex aggregaten gelegen of in de lamina densa of op de grens van de lamina densa en de lamina rara externa. De epitheelvoetjes zijn op deze plaatsen niet gefuseerd (f 60). Daarnaast worden op enkele plaatsen grotere aggregaten gezien, gelegen in de lamina rara externa, waarbij ook spike vorming optreedt (f 61). Soms is de lamina rara interna verbreed. Hier worden enkele complex aggregaten aangetoond (f 60, f 61). De GBM is gekronkeld langs het mesangiale gebied, terwijl de structuur hier niet goed herkenbaar is, mogelijk door afzetting van immuuncomplex aggregaten in alle lagen van de GBM (f 62). Interpositie van het mesangium is plaatselijk aanwezig.

Proteinurie: Zoals in hoofdstuk V uiteengezet, ontbrak in de met konijnen IgG van „boeren” konijnen opgewekte glomerulonefritis proteinurie.

VIII. Het effect van endoxan-gelijk

De licht microscopie toont in deze groep geen enkel verschil met de NH en zal daarom verder niet besproken worden.

Twee dagen

Het fluorescentie- en elektronen microscopische beeld is geheel gelijk aan dat van de NH.

Dertig dagen

Door intercurrente sterfte van proefdieren kon het beeld van dertig dagen niet bestudeerd worden.

Negentig dagen

Fluorescentie microscopie: Het beeld toont ook hier, evenals in de endoxan-vooraf groep, een duidelijk verschil in afzetting tussen ratten IgG en konijnen IgG. De afzetting van ratten IgG is minder sterk dan in de NH, terwijl de afzetting van konijnen IgG geheel gelijk is aan die van de NH, evenals de afzetting van C'.

Elektronen microscopie: Het beeld toont naast kleine, meerdere grote immuun-complex aggregaten gelegen of in de lamina densa of op de grens lamina densa/lamina rara externa. Daarnaast zijn er ook meerdere grote aggregaten in de lamina rara externa, waarboven de epitheelvoetjes zijn gefuseerd. Ook worden hier nog enkele kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna aangetroffen. Spike vorming kan lokaal aangetoond worden. Tevens is er plaatselijk interpositie van het mesangium. Het beeld verschilt niet duidelijk van het beeld zoals gevonden in de endoxan-vooraf groep, afgemaakt na negentig dagen.

Proteinurie: Aangezien de complex glomerulonefritis werd opgewekt met IgG van „boeren” konijnen trad geen proteinurie op.

IX. Het effect van endoxan na tien dagen

Het licht microscopisch beeld was geheel gelijk aan dat van de NH en zal derhalve niet worden besproken.

Twee dagen

Gezien het feit dat hier eerst na tien dagen met het geven van endoxan werd begonnen, was het beeld na twee dagen uiteraard gelijk aan dat van de NH.

Dertig dagen

Fluorescentie microscopie: Er is een afzetting van konijnen IgG die identiek is met die van de NH, evenals dit het geval is met de afzetting van C'. De afzetting van ratten IgG is ook nu minder duidelijk dan die bij de NH (f 63).

Elektronen microscopie: Het elektronen microscopische beeld toont grotere immuuncomplex aggregaten die zowel in de lamina rara externa alsook sub-endotheliaal in de lamina rara interna zijn gelegen. Boven de subepitheliaal gelegen complex aggregaten zijn de epitheelvoetjes gefuseerd. Daarnaast worden

ook in de lamina densa meerdere, overwegend kleine aggregaten aangetroffen (f 64).

Negentig dagen

Fluorescentie microscopie: De fluorescentie microscopie is nu identiek aan de NH. De afzetting van ratten IgG is dus kennelijk toegenomen ten opzichte van de groep die werd afgemaakt na dertig dagen.

Elektronen microscopie: We zien matig grote immuuncomplex aggregaten, die merendeels in de lamina rara externa liggen, niet direkt tegen het epitheel aan. De lamina rara externa lijkt hierdoor verbreed te zijn, terwijl bovendien plaatselijk een aanduiding van spike vorming is (f 65). Ook wordt interpositie van het mesangium gezien (f 66). De GBM is gelijkmatiger dan in de NH.

Proteinurie: Ook in deze groep trad geen proteinurie op, aangezien ook hier de complex glomerulonefritis werd opgewekt met IgG van „boeren” konijnen.

X. Het effect van indocid-vooraf

Het licht microscopische beeld is in deze groep geheel gelijk aan dat van de NH en zal daarom verder niet ter sprake komen.

Twee dagen

Fluorescentie microscopie: Het fluorescentie beeld is niet te onderscheiden van de NH.

Elektronen microscopie: We zien een wat wazige GBM, waarin de immuuncomplex aggregaten merendeels in de lamina densa worden aangetroffen. Bovendien worden vooral langs het mesangium aggregaten in de lamina rara interna gezien (f 67). Het mesangium zelf toont geen duidelijke afwijkingen.

Dertig dagen

Fluorescentie microscopie: Het beeld is anders dan in de NH. De afzetting van konijnen IgG lijkt minder uitgesproken te zijn, er zijn minder fluorescerende granulae in de GBM. De afzetting van ratten IgG verschilt niet van die van de NH, evenals dat het geval is voor de afzetting van C'.

Elektronen microscopie: Er worden slechts weinig immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa aangetroffen (f 68). Fusie van de epitheelvoetjes ontbreekt. Het merendeel der immuuncomplex aggregaten wordt gezien in de lamina densa en de lamina rara interna (f 69, f 70). Plaatselijk wordt interpositie van mesangium gezien.

Negentig dagen

Fluorescentie microscopie: Er wordt een afzetting van konijnen IgG gezien, diffuus door de glomerulus, die echter minder uitgesproken lijkt te zijn dan in de NH (f 71). De afzetting van ratten IgG lijkt zeker zo sterk als in de NH en geeft de indruk sterker te zijn dan de afzetting van konijnen IgG (f 72).

Elektronen microscopie: We zien vrij veel immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna (f 73). Het merendeel der immuuncomplex aggregaten ligt in de lamina densa. Langs de in de lamina rara externa afgezette immuun-

complex aggregaten is een duidelijke spike vorming waarneembaar (f 74). De GBM is lokaal zeer sterk gekronkeld, terwijl ook delen van de GBM over grotere afstand zijn verdubbeld (f 75). Het mesangium toont een zeer sterke toename van matrix. De GBM lijkt hier soms in enkele lagen op elkaar gevouwen te zijn, waarbij celdelen worden ingesloten (f 76).

Proteinurie: Aangezien deze complex glomerulonefritis werd opgewekt met konijnen IgG afkomstig van „boeren” konijnen trad geen proteinurie op, zoals in hoofdstuk V werd uiteengezet.

XI. Het effect van indocid-gelijk:

Het licht microscopische beeld is in deze groep geheel gelijk aan dat gevonden in de NH, zodat deze verder niet ter sprake zal komen.

Twee dagen

Fluorescentie microscopie: Het beeld is identiek aan dat van de NH.

Elektronen microscopie: We zien in deze groep het merendeel der immuuncomplex aggregaten in de lamina densa, met slechts enkele kleine aggregaten in de lamina rara externa. Opvallend is dat ook hier immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna worden aangetroffen. Het mesangium toont geen afwijkingen.

Dertig dagen

Door intercurrente sterfte van de proefdieren, konden wij het beeld na dertig dagen niet bestuderen.

Negentig dagen

Fluorescentie microscopie: In vergelijking tot de NH zien we slechts een geringe afzetting van konijnen IgG, dat wil zeggen weinig fluorescerende granulae per glomerulus (f 77). De afzetting van ratten IgG is veel duidelijker en verschilt niet van die in de NH (f 78). Ook het beeld van de afzetting van complement is geheel gelijkwaardig aan dat gevonden in de NH.

Elektronen microscopie: Het elektronen microscopische beeld toont immuuncomplex aggregaten in de lamina densa. De GBM en vooral de lamina densa lijkt hierdoor onregelmatig verdikt te zijn (f 79). Enkele immuuncomplex aggregaten liggen in de lamina rara externa, doch dan niet direkt tegen het epitheel aan. Er blijft GBM materiaal tussen de aggregaten en het epitheel zichtbaar, terwijl er tevens sprake is van spike vorming. De immuuncomplex aggregaten zijn over het algemeen kleiner dan in de NH. Langs het mesangium worden sterke verbredingen van de lamina rara interna gevonden waarin, evenals in de rest van de GBM, soms immuuncomplex aggregaten kunnen worden gezien (f 80). Van fusie van epitheelvoetjes is geen sprake.

Proteinurie: Aangezien bij het opwekken van deze complex glomerulonefritis gebruik werd gemaakt van IgG van „boeren” konijnen werd geen proteinurie waargenomen.

XII. Het effect van indocid na tien dagen

Het licht microscopische beeld toonde op geen enkel moment enig verschil t.o.v. de NH en zal derhalve hier niet meer ter sprake komen.

Twee dagen

Aangezien hier eerst na tien dagen werd gestart met het toedienen van indocid, was het histologische beeld na twee dagen in deze groep identiek aan dat van de NH.

Dertig dagen

Fluorescentie microscopie: We zien een afzetting van konijnen IgG die zeker gelijkwaardig is aan de NH (f 81), evenals de afzettingen van ratten IgG (f 82) en C'.

Elektronen microscopie: Het beeld in de elektronen microscopie toont immuuncomplex aggregaten die merendeels in de lamina rara externa zijn gelegen. Er is sterke spike vorming te zien en wel in een zó sterke mate als die in nog geen andere groep na dertig dagen werd gevonden (f 83). Van fusie van epitheelvoetjes is echter geen sprake. Het mesangium bevat vrij veel matrix.

Negentig dagen

Fluorescentie microscopie: Het fluorescentie beeld toont geen verschil met dat van de NH.

Elektronen microscopie: De elektronen microscopie toont meer immuuncomplex aggregaten die geheel door GBM materiaal zijn omgeven (f 84). Tevens vinden we sterke spike vorming langs de grote immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa (f 84, f 85). Een enkel immuuncomplex aggregaat lijkt in de lamina densa te liggen (f 85). Subendotheliaal, in de lamina rara interna, worden eigenlijk geen immuuncomplex aggregaten gevonden. Het mesangium toont een sterke toename van matrix, zoals ook in de andere indocid groepen werd gevonden.

Proteinurie: Aangezien de hier gebruikte complex glomerulonefritis werd opgewekt met IgG van „boeren” konijnen trad geen proteinurie op.

C. SAMENVATTING RESULTATEN

I. Elektronen microscopie: De belangrijkste verschillen tussen de NH en de diverse geneesmiddelen groepen werden waargenomen in de elektronen microscopie. De samenvatting van de resultaten hiervan worden weergegeven in schema II met een korte bijbehorende tekst op pagina 42, 43.

II. Licht microscopie: Licht microscopisch zien we in de NH een aanvankelijke lichte zwelling van epitheel en mesangium, die na tien dagen geheel is verdwenen. Vanaf dertig dagen zien we een verbreding van het mesangium met toename van PAS/zilver positief materiaal. De GBM gaat iets kronkelen en wordt onregelmatig van dikte. Andere afwijkingen konden licht microscopisch niet aangetoond worden.

De licht microscopie van de groepen die geneesmiddelen kregen was op geen enkel moment te onderscheiden van de NH.

III. Fluorescentie microscopie: In de immunofluorescentie zien we in alle groepen een identieke, geringe afzetting van konijnen IgG en C' na twee dagen.

In de NH blijkt de afzetting van konijnen IgG na tien dagen haar maximum te bereiken. Dit fluorescentie niveau blijft gedurende de gehele proefperiode gehandhaafd. De afzetting van C' is eveneens na tien dagen op haar maximale niveau en neemt hierna niet duidelijk af. De afzetting van ratten IgG is na tien dagen goed zichtbaar, na dertig dagen maximaal en neemt daarna niet af. Het fluorescentie patroon is steeds dezelfde; deels fijn, deels grof korrelige afzetting langs de GBM.

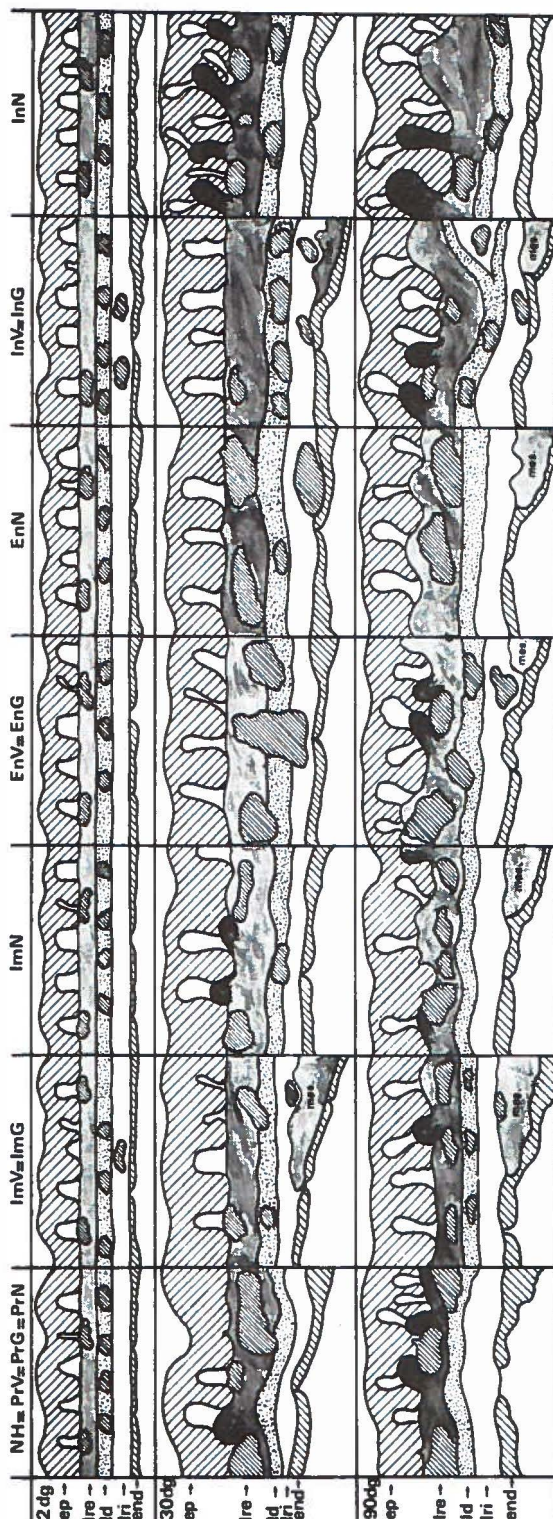
Prednison toonde in de immunofluorescentie in geen der groepen verschil t.o.v. de NH.

De imuran-vooraf en imuran-gelijk groepen toonden aanvankelijk (beeld na tien dagen) een minder sterke afzetting van konijnen IgG dan in de NH. Dit verschil was in de volgende groepen niet meer aantoonbaar. De imuran-na groep toonde geen verschillen t.o.v. de NH.

De endoxan-vooraf en endoxan-gelijk groepen toonden een afzetting van konijnen IgG en C' die geheel gelijkwaardig was met die van de NH. De afzetting van ratten IgG leek achter te blijven. Endoxan-na toonde een achterblijven van de afzetting van ratten IgG na dertig dagen. Na negentig dagen was t.o.v. de NH geen verschil meer waarneembaar.

In de indocid-vooraf en indocid-gelijk groepen blijft de afzetting van konijnen IgG achter t.o.v. de NH, terwijl de afzetting van C' en ratten IgG geheel te vergelijken is met de NH. Dit verschil in afzetting van konijnen IgG t.o.v. de NH is in de indocid-na groep niet aanwezig.

IV. Proteinurie: Wat betreft de proteinurie verwijs ik naar de grafieken I t/m VII, op resp. pagina 72 t/m 78. In de complex glomerulonefritis opgewekt met konijnen IgG van „boeren” konijnen trad geen proteinurie op.



2 dg.		30 dg.		90 dg.	
NH : PrV PrG PrN	Kleine COAG in ld en lre, voornamelijk in sp. GBM niet verdikt.	Grote COAG in lre, fusie van ep voetjes. Onregelmatig verdikte GBM. Beginnende spike vorming.		Grote COAG met spikes. Soms COAG geheel omgeven door GBM. GBM onregelmatig verdikt.	
ImV: ImG	Als de NH, met enkel COAG in lri.	Kleine COAG in lre, enkele in ld en een sporadische in lri. GBM niet verdikt. Mes: interpositie.		Kleine COAG in lre en ld. GBM niet verdikt. Mes: interpositie.	
ImN:	Gelijk aan de NH.	Ongeveer als NH. Een enkel COAG in ld. GBM iets minder verdikt. Mes: interpositie.		Totaal beeld als NH. COAG iets kleiner. Mes: interpositie.	
EnV: EnG	Gelijk aan de NH.	De COAG iets kleiner, op grens ld/lre. Enkele COAG door gehele breedte GBM. GBM niet verdikt.		COAG wisselend van grootte merendeels in lre, tegen ld aan, soms geheel in ld. Weinig spikes. Mes: interpositie.	
EnN:	Gelijk aan de NH.	Merendeels als NH, maar ook een enkel COAG in ld en lri.		Merendeels als NH, met spike vorming. COAG vrijwel alle geheel door GBM omgeven. Mes: interpositie.	
InV: InG	Meeste COAG in ld, maar ook nog veel in lri en enkele in lre.	COAG meest kleiner dan in NH, merendeels in ld. Nu ook meerdere in lri. Ook COAG in lre. GBM niet verdikt. Mes: interpositie.		Meeste COAG in, of tegen ld. Enkele in lri. Bij COAG in lre sterkere spike vorming dan in NH. Verdubbeling GBM. Mes: interpositie.	
InN:	Gelijk aan de NH.	Kleinere COAG in lre. Sterke spike vorming! Veel COAG in ld. GBM onregelmatig verdikt.		COAG iets kleiner dan in NH. Meer spike vorming dan in NH en meer GBM tussen COAG en ep. Toch ook nog COAG in ld.	

AFKORTINGEN:

NH = natural history; Pr = prednison; Im = imuran; En = endoxan; In = indocid; V = geneesmiddel vooraf; G = geneesmiddel gelijk; N = geneesmiddel na 10 dg.; ep = epitheel; end = endotheel; GBM = glomerulaire basaalmembraan; lre = lamina rara externa; ld = lamina densa; lri = lamina rara interna; sp = slit pore; mes = mesangium; COAG = immuuncomplex aggregaat.

DISCUSSIE

A. Het model

Zoals in hoofdstuk V werd uiteengezet, werd een experimentele immuuncomplex glomerulonefritis opgewekt bij ratten door het inspuiten van heterologe (konijnen)antilichamen, gericht tegen Fx_1A , afkomstig uit tubuluscellen van de ratten-nier. Reeds vijf uur na de toediening van dit konijnen antilichaam, konden afzettingen van dit konijnen IgG in de GBM worden aangetoond in een granulair patroon. Dit patroon wijst op de afzetting van immuuncomplexen waarvan het ingespoten konijnen IgG kennelijk deel uitmaakt. We moeten dus aannemen, dat vrijwel direkt na inspuiting, het konijnen IgG met het antigeen waartegen het gericht is een binding aangaat, die de vorming van oplosbare circulerende immuuncomplexen tot gevolg heeft, die vervolgens o.a. in de GBM worden afgezet. Dit is slechts dan mogelijk, als het antigeen (Fx_1A) in het serum aanwezig is. EDGINGTON (35) en GLASSOCK (49) toonden inderdaad aan, dat Fx_1A in zeer kleine hoeveelheden in het serum van de rat circuleert. Bovendien bleek uit de door ons verrichte elutie studies, dat Fx_1A inderdaad deel uit maakt van de in de glomeruli afgezette immuuncomplexen (f 6).

Aangezien het afgezette immuuncomplex heterologe antilichamen (konijnen IgG) bevat, zal een immuunreactie van de rat zelf resulteren in de vorming van auto-antilichamen tegen dit heterologe konijnen IgG, die eveneens in de immuuncomplexen zullen worden afgezet. Deze autologe antilichamen zijn inderdaad na zeven tot tien dagen in de glomeruli aantoonbaar, eveneens in een granulair patroon (f 5). Ook blijkt ratten C' gebonden te worden in de afgezette immuuncomplexen; gedurende de eerste dagen (heterologe fase) in een zeer geringe mate (f 9), hierna (autologe fase) in toenemende mate (f 11). We mogen derhalve aannemen dat de afgezette heterologe en autologe antilichamen beiden C' bindend zijn.

De afgezette immuuncomplexen blijven gedurende een lange tijd (tenminste zeven maanden) aantoonbaar in de GBM (niet gepubliceerde eigen gegevens).

Het doel van dit onderzoek was om de afzetting en het gedrag van immuuncomplexen in de GBM en de invloed hierop van geneesmiddelen te bestuderen. Er werd naar gestreefd een hoeveelheid heteroloog antilichaam toe te dienen, waardoor slechts een beperkt aantal immuuncomplexen zouden worden afgezet in de GBM. Dit kon worden bereikt, door alle ratten een éénmalige injectie van 10 mg konijnen anti Fx_1A toe te dienen. Hierdoor wordt de bestudering van het gedrag van de immuuncomplex aggregaten in tijd en de invloed van geneesmiddelen op dit gedrag vereenvoudigd. Afzetting van te grote hoeveelheden immuuncomplex aggregaten in de GBM zou eventuele effecten van geneesmiddelen kunnen overschaduwen.

Na deze dosis wordt soms een stijging van de proteinurie bij de ratten waargenomen (indien gebruik werd gemaakt van IgG van Witte Wener konijnen),

soms bleef een duidelijke proteinurie verhoging achterwege (indien gebruik werd gemaakt van IgG van „boeren” konijnen).

Het leek ons echter van groter belang het gedrag van de immuuncomplex-aggregaten te bestuderen, dan een eventueel gevolg daarvan, reden waarom de dosis konijnen IgG niet werd verhoogd.

B. Het natuurlijke beloop

Het bleek dat de hoeveelheid toegediend konijnen anti Fx₁A te gering was om duidelijke afwijkingen in de licht microscopie te veroorzaken. Na twee dagen werd een geringe zwelling van epitheel en mesangium gezien, terwijl tegen het einde van de proef alleen toename van mesangiale matrix werd waargenomen. Grove basaalmembraan veranderingen zoals spikes konden licht microscopisch niet worden aangetoond (f 7^a, 7^b, 14, 15, 24).

De toediening van (Witte Wener) konijnen anti Fx₁A resulteerde echter wel in een, zij het geringe, proteinurie stijging. Direct na toediening van het anti-serum werd een verhoging van de proteinurie gezien, die later weer verdween (zie grafiek I pg. 72). Deze proteinurie, die niet optreedt wanneer normaal konijnen IgG wordt ingespoten (niet gepubliceerde eigen gegevens), berust zeer waarschijnlijk op het feit dat de vrijwel onmiddellijk in het serum gevormde immuuncomplexen van het ingespoten konijnen IgG en het ratten Fx₁A, vasoactieve aminen uit de bloedplaatjes vrij maken, waardoor een kort durende proteinurie optreedt (RATNOFF, 100). Na \pm tien dagen wordt opnieuw een stijging van de proteinurie gezien, die samen valt met het begin van de autologe fase. Deze stijging moet waarschijnlijk verklaard worden door het feit dat omstreeks deze tijd duidelijk meer C' in de afgezette immuuncomplex-aggregaten kan worden aangetoond. Hierdoor wordt de GBM kennelijk zo beschadigd, dat verhoogde doorlaatbaarheid optreedt. Waarom na \pm 30 dagen opnieuw een stijging van de proteinurie wordt gezien kunnen we niet verklaren. Een theoretische overweging zou hier zijn, dat een nieuwe fase optreedt, waarin de rat antilichamen gaat maken tegen zijn eigen Fx₁A. Uit onderzoeken van HEYMANN (58), GLASSOCK (49) en EDGINGTON (35, 36, 37), blijkt dat dit zeker mogelijk is. Hoewel wij hiervoor wel aanwijzingen hebben gevonden, kon een overtuigend bewijs voor deze veronderstelling echter (nog) niet verkregen worden. Naar aanleiding van de resultaten met het geneesmiddel indocid komen wij hierop terug (blz. 54).

Met immunofluorescentie is kwalitatieve bepaling van afgezette immuuncomplexen mogelijk. Een vergelijking van afgezette hoeveelheden en een exacte plaatsbepaling is echter zeer moeilijk. Voor deze plaatsbepaling en beoordeling van de grootte van de afzettingen hebben we elektronen microscopie resp. immuno-elektronen microscopie nodig.

Na twee dagen worden elektronen dichte afzettingen in de GBM waargenomen, die met immuno-elektronen microscopie als aggregaten van immuuncomplexen konden worden geïdentificeerd. Deze afzettingen bevonden zich voornamelijk in de lamina densa, terwijl tevens enkele aggregaten in de lamina rara externa werden aangetroffen, speciaal in de „slit pores” (f 10); afzettingen in de lamina rara interna zijn er niet. Bij het vervolgen van de glomerulonefritis worden wijzigingen van dit beeld gezien. De afgezette immuuncomplex aggre-

gaten worden duidelijk groter na tien (f 12) en dertig (f 18) dagen, wat overeenkomt met het grovere karakter van de afzettingen gezien met immunofluorescentie (vgl. f 2-f 8). Met het groter worden van de immuuncomplex aggregaten wordt de lokalisatie in de „slit pores” minder duidelijk, enerzijds omdat bij aangroeien van de aggregaten ze zich vanuit de slit pores gaan uitstrekken tot onder de epitheelvoetjes (f 18), anderzijds omdat reeds na tien dagen (f 12) maar vooral na dertig en negentig dagen (f 19, 28) de epitheelvoetjes fusie tonen. Na dertig dagen, maar vooral na negentig dagen blijkt er GBM substantie te worden afgezet aan weerszijden van de immuuncomplex aggregaten, waardoor het beeld van „spikes” ontstaat (f 19, 26). Eveneens na dertig dagen, maar vooral na negentig dagen blijkt er GBM substantie te worden afgezet tussen epitheelvoetjes en immuuncomplex aggregaten (f 20, 27, 28, 29). Het vervolgen van de afgezette immuuncomplex aggregaten in deze complex glomerulonefritis suggereert een doortrekken van deze aggregaten door de GBM. Hoewel wij geen immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna gezien hebben, blijkt duidelijk dat het overgrote deel van de afzettingen zich na twee dagen in de lamina densa bevond, terwijl na deze tijd hier geen afzettingen meer konden worden aangetoond, maar ze alle in de lamina rara externa lagen.

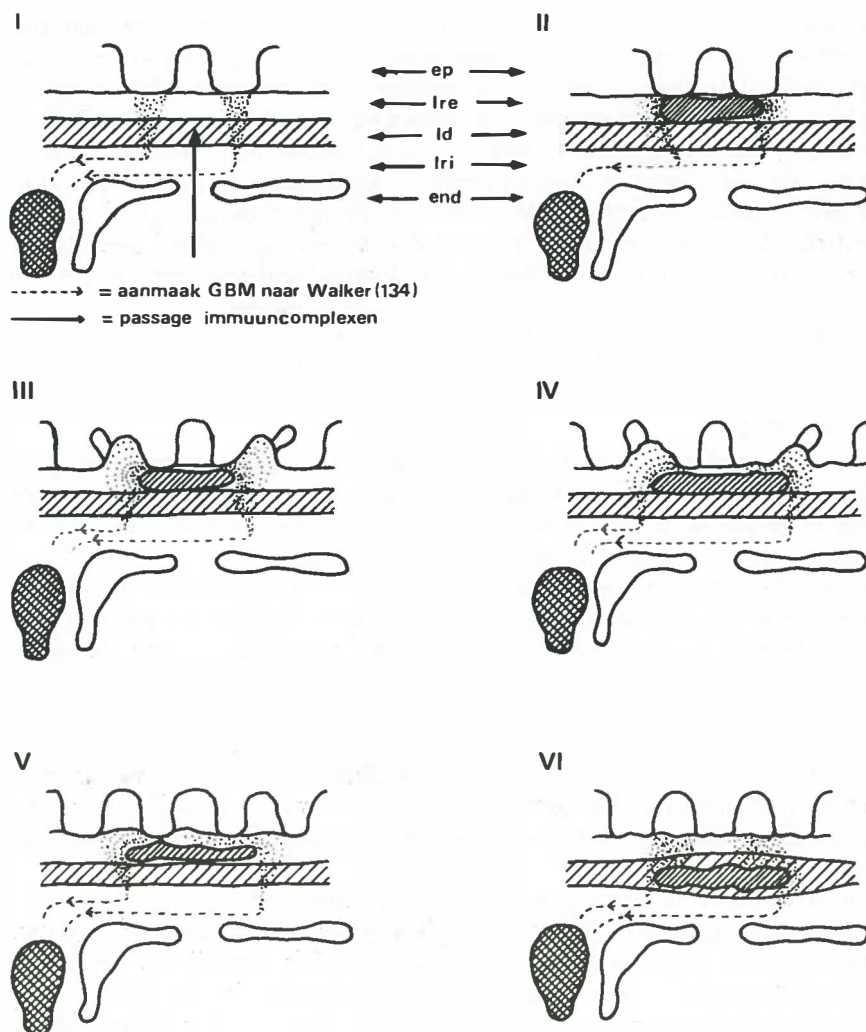
De gedachte dat de aggregaten de GBM doortrekken wordt gesteund door het werk van KARNOVSKY (62) en VENKATACHALAN (130) die met behulp van elektronendichte „tracers” aantoonde dat de lamina densa in de GBM de belangrijkste passage belemmering vormt voor grote eiwitten en dus ook voor immuuncomplex aggregaten. Door deze belemmering zal de passage door de lamina densa trager zijn dan de passage door de lamina rara interna of externa. Zij toonden tevens aan dat een tweede belangrijke barrière wordt gevormd door de „slit pore membrane”, een klein membraantje dat gespannen is tussen twee aangrenzende epitheelvoetjes. Waarschijnlijk is dit de reden dat wij de eerste afzettingen van immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa voorname-lijk in de slit pore kunnen waarnemen.

Nieuwe afzettingen van immuuncomplexen zullen eveneens op deze plaatsen worden afgezet, waardoor de afzettingen verder aangroeien tot aggregaten en zich uitstrekken tot onder de epitheelvoetjes.

De afzettingen van GBM substantie aan weerszijden van en aan de bovenzijde van immuuncomplex aggregaten, waardoor de GBM een onregelmatig aspect kreeg en z.g.n. spikes ontstonden (zie schema III, pagina 47), kunnen verklaard worden in overeenstemming met een aantal onderzoeken waarbij argumenten werden verkregen voor de veronderstelling dat de epitheelcellen de GBM substantie vormen (STRIKER 114a, WALKER 134, FARQUHAR 40, 41, 42).

Schema III. Schematische voorstelling van GBM synthese met en zonder aanwezigheid van immuun-complex aggregaten (modificatie naar WALKER 134).

I. De epitheelcel produceert nieuwe GBM substantie. Er wordt een bepaalde stroom in de GBM verondersteld, waarbij nieuw aangemaakte GBM zich verplaatst in de richting van het capillaire lumen, waarbij een verdichting tot lamina densa (ld) optreedt, die dan weer „oplost” om samen met eventuele filtratie residuen uit de lamina rara interna (lri) te worden afgevoerd via het mesangium.



II. Door opschuiving en nieuwe afzetting van immuuncomplexen ontstaat een groot aggregaat, dat zich vanuit de slit pore uitstrekt tot onder de epitheelvoetjes, daarmee, de normale afvoer stroom van nieuwe GBM blokkerend.

III. De nieuw gevormde GBM wordt langs het aggregaat afgezet en afgevoerd, waardoor langs het aggregaat een ophoping van GBM substantie ontstaat, die het beeld van spikes geeft.

IV-V. De nieuw gevormde GBM hoopt zich dusdanig op, dat tenslotte vanaf de randen van het aggregaat GBM substantie tussen aggregaat en epitheel blijft liggen, waardoor de indruk wordt gewekt dat de aggregaten worden weggedrukt van het epitheel.

VI. Indien door nieuw aanmaak van GBM de afstand aggregaat-epitheel groot genoeg is, dan kan boven het aggregaat weer een verdichting tot Id optreden.

Het is mogelijk dat de normale aanmaak van GBM substantie door het epitheel bij aanwezigheid van complex aggregaten in de lamina rara externa, een beeld van spikes kan doen ontstaan. De snelheid van normale GBM synthese wordt echter zo verschillend geschat (variërend van 1 tot 9 maanden; WALKER 134, DAHA 29), dat een speculatie hierover weinig zinvol lijkt. Waarschijnlijker is echter o.i. dat de afgezette immuuncomplex aggregaten de epitheelcel prikkelen tot het vormen van extra GBM substantie. Bij nefrotoxische glomerulonefritis werd een dergelijke verhoging van GBM synthese aangetoond door DAHA (29). De mogelijkheid dat andere vormen van glomerulonefritis eveneens tot een verhoogde synthese aanleiding geven lijkt dus zeker aanwezig.

Een voortdurende afzetting van GBM substantie door de epitheelcel boven het immuuncomplex aggregaat, kan het beeld geven van een verdubbeling van de GBM waarbinnen (een restant van) een immuuncomplex aggregaat is gevangen (f 20, 28, 29).

De fusie van epitheelvoetjes die boven de afzettingen van immuuncomplex aggregaten gezien wordt, moet volgens de algemeen geldende opvatting als gevolg van de proteinurie worden beschouwd en staat niet in directe relatie tot de afzettingen van immuuncomplexen in de GBM (FISHER 45a).

De mesangiale veranderingen zoals gezien in de licht microscopie (f 14, 15, 24) en elektronen microscopie (f 13) blijken vooral te bestaan uit een toename van mesangiale matrix. Deze matrix toename kan het gevolg zijn van de afzetting van immuuncomplexen (of immuuncomplex aggregaten) in de GBM. Veel onderzoekers (VERNIER 132, FARQUHAR 40, 41, 42, MICHAEL 90, FISH 45, OKUDA 96) beschouwen het mesangium n.l. als een gebied dat een belangrijke functie heeft bij de afvoer van filtratie residuen uit de GBM. Een toename van mesangiale matrix zou derhalve het gevolg kunnen zijn van een prikkeling van mesangiale cellen door de immuuncomplex aggregaten, die daar terecht zijn gekomen.

Wij zijn echter niet in staat geweest om met immunofluorescentie of elektronen microscopie aggregaten in het mesangiale gebied aan te tonen (f 45). Een andere mogelijkheid zou echter zijn, dat gezien het feit dat bij het vervolgen van de glomerulonefritis de immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa blijven liggen, het mesangiale gebied tekort schiet in haar functie bij de afvoer van filtratie residuen. Als reactie hierop zou een excessieve hoeveelheid matrix gevormd kunnen worden (FARQUHAR 42).

De afwijkingen gevonden bij de complex glomerulonefritis opgewekt met het IgG van „boeren” konijnen verschilden niet van die gevonden bij de complex glomerulonefritis opgewekt met IgG van Witte Wener konijnen. Bij deze laatste groep ontbrak echter de proteinurie. Er werd wel fusie van epitheelvoetjes waargenomen, hetgeen wijst op verhoogde doorlaatbaarheid van de GBM (FISHER 45a). Blijkbaar was deze verhoogde doorlaatbaarheid niet van zo'n omvang dat de terug resorptie capaciteit van de tubulus werd overschreden.

Bovenstaande zou de indruk kunnen wekken, dat elke afzetting van immuuncomplex aggregaten in de GBM aanleiding zou geven tot spikevorming. Uit de menselijke pathologie is echter bekend, dat spike vorming van de GBM slechts in zeer speciale gevallen kan worden waargenomen (o.a. bij membraneuze glo-

merulonefritis). Dit zou kunnen betekenen dat naast het chronisch karakter van de glomerulonefritis, de aard van de immuuncomplex afzettingen (grootte, lading, samenstelling) van betekenis is bij het al of niet ontstaan van spikes. Vorming van spikes bij EGN worden slechts waargenomen bij de immuuncomplex glomerulonefritis beschreven door VAN ES (39) en bij de auto-immuuncomplex glomerulonefritis van HEYMANN (58).

In deze experimentele modellen vormt, evenals in ons model, het Fx_1A zeer waarschijnlijk het antigene bestanddeel van het immuuncomplex. Het ligt dus voor de hand te veronderstellen dat juist de aard van dit antigeen en de wijze waarop daarmee immuuncomplexen worden gevormd voorwaarde is voor het ontstaan van spikes.

C. Het effect van geneesmiddelen

Zoals in hoofdstuk IV werd medegedeeld werden bij het bestuderen van het effect van geneesmiddelen steeds drie groepen onderscheiden:

Een groep die geneesmiddelen kreeg vanaf vier dagen voor het opwekken van de complex glomerulonefritis, zodat we mochten aannemen dat ten tijde van het opwekken van de glomerulonefritis een voldoende hoge bloedspiegel van het geneesmiddel aanwezig was.

Een tweede groep die het geneesmiddel kreeg vanaf het moment waarop de glomerulonefritis werd opgewekt.

Een derde groep die het geneesmiddel kreeg toegediend vanaf tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis, wanneer we mochten aannemen dat de autologe fase in gang was gezet.

Op deze wijze waren we in staat het effect van geneesmiddelen op de vorming en afzetting van immuuncomplexen te bestuderen evenals het effect op reeds afgezette immuuncomplexen.

I. Prednison

Licht microscopisch en met immunofluorescentie konden we in geen der drie prednison groepen enig verschil t.o.v. de NH groep aantonen. Ook het beloop van de proteinurie in de drie groepen (grafiek I, II, III, IV, pg. 72 t/m 75) was op een enkele uitzondering na steeds vergelijkbaar met dat van de NH.

Elektronen microscopisch werden enkele geringe verschillen aangetroffen in de groep die prednison voor- en tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis kregen toegediend. In deze groepen werden vooral na twee en na tien dagen iets meer immuuncomplex aggregaten in de lamina densa gezien dan bij de NH. Na dertig en negentig dagen waren deze verschillen echter weer verdwenen. Dit lijkt er op te wijzen dat de passage van immuuncomplex aggregaten door de GBM tengevolge van prednison, wanneer althans vooraf of tegelijkertijd gegeven, enigszins is vertraagd. Dit zou overeen kunnen stemmen met de bevindingen van MISRA (94), die aantoonde dat het toedienen van prednison veranderingen teweeg brengt in de chemische samenstelling van de GBM. Deze veranderingen zijn kennelijk te gering om een duidelijk effect op het verdere beloop van de glomerulonefritis te bewerkstelligen. MISRA (94) vond echter ook een

verlaging van de proteinurie na toediening van prednison. Hoewel de proteinurie bij de groep die prednison tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis kreeg toegediend na dertig en na negentig dagen significant lager was dan die van de NH, konden we over het algemeen, vooral in de groepen die prednison vooraf en tegelijkertijd kregen toegediend, geen positief effect van het geneesmiddel waarnemen. Het significante verschil van de eiwit uitscheiding in de prednison-na groep na dertig en negentig dagen, kunnen wij niet verklaren. De mogelijkheid dat het hier een toevallige bevinding betreft blijft bestaan.

Dat er geen effect van prednison kon worden waargenomen, kan een gevolg zijn van de dosering van het geneesmiddel. In de proefopzet werd een dosering gebruikt die te vergelijken is met de dosering gebruikt in de menselijke nefropathologie. Theoretisch is het mogelijk dat deze dosering voor ratten relatief te laag is. Andere doseringen werden door ons niet beproefd. SY LIM (117) vond echter in het autologe immuuncomplex glomerulonefritis model naar HEYMANN (58) bij een hogere dosering van prednison evenmin effect.

II. Imuran

Gezien de resultaten kunnen de gegevens van de groepen die imuran vooraf en tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis kregen toegediend gezamenlijk worden besproken, aangezien tussen deze groepen geen noemenswaardige verschillen konden worden waargenomen. Licht microscopisch tonen deze twee groepen op geen enkel moment verschillen t.o.v. de NH groepen.

De immunofluorescentie toont na tien dagen een mogelijk iets geringere afzetting van ingespoten konijnen IgG langs de GBM dan in de NH groep. De reden van deze verminderde afzetting blijft onduidelijk. Aangezien de waargenomen verschillen gering waren (vgl. f 2-f 38) en omdat het bijzonder moeilijk is immunofluorescentie beelden te vergelijken op kwantiteit, moeten we rekening houden met de mogelijkheid dat de waargenomen geringe verschillen geen betekenis hebben. Dit wordt ondersteund doordat na dertig en negentig dagen (vgl. f 22- f 41) in de immunofluorescentiebeelden geen verschillen meer werden gezien t.o.v. de NH. De elektronen microscopische beelden toonden echter in deze twee groepen vrij grote verschillen met die van de NH. Over het algemeen waren deze verschillen na twee dagen nog gering. Kennelijk heeft het geneesmiddel imuran dus geen invloed op de binding van het toegediende konijnen IgG en het in het serum van de rat circulerende Fx₁A. Wel werden er na twee dagen enkele afzettingen van immuuncomplex-aggregaten in de lamina rara interna waargenomen (f 37). Dit is waarschijnlijk een uiting van een vertraagde passage van de immuuncomplex aggregaten door de GBM. Hierop wijst ook het feit dat na tien, dertig (f 40, 48) en negentig dagen (f 45) nog steeds immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna worden aangetoond. Bovendien waren er, anders dan bij de NH, diverse immuuncomplex aggregaten zichtbaar in de lamina densa na dertig (f 40) en negentig dagen (f 43).

Over het algemeen genomen waren alle afzettingen in de GBM kleiner dan in de NH groep (f 39, 40, 43, 44, 49). Dit kan het gevolg zijn van het effect van het imuran op de autologe fase. Immers aangezien imuran een immuun-suppressivum is, is het zeer goed mogelijk dat dit geneesmiddel, wanneer vanaf vier dagen voor of tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis

gegeven, een duidelijke invloed heeft op de vorming van antilichamen door de rat tegen het ingespoten heterologe konijnen IgG. Hierdoor kan de autologe fase duidelijk geremd worden (gezien de afzetting van ratten IgG in de GBM werd de autologe fase niet totaal voorkomen), waardoor de participatie van ratten IgG aan de in de GBM afgezette immuuncomplex aggregaten vermindert. Hierdoor kunnen dan de immuuncomplex aggregaten kleiner blijven dan in de NH, hetgeen echter niet met de immunofluorescentie techniek kon worden aangetoond.

De geconstateerde vertraagde passage van immuuncomplex aggregaten door de GBM zou in dit verband kunnen berusten op de veranderde vorm, grootte en eventuele lading van de aggregaten nu het ratten IgG minder bijdraagt aan de vorming daarvan. De vertraagde passage na twee dagen kan hiermee echter niet verklaard worden. Van een eventuele invloed van imuran op de chemische samenstelling van de GBM, die een vertraagde passage van immuuncomplex aggregaten tot gevolg zou kunnen hebben, is echter niets bekend in de literatuur. Dat de afzetting van GEM substantie langs immuuncomplex aggregaten en spike vorming pas in een later stadium (negentig dagen) en in geringere mate dan in de NH wordt gezien, kan verklaard worden door het geringe aantal en het kleiner blijven van de immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa. Het valt dan voorts op dat er vaker GBM substantie tussen het aggregaat en de epitheelvoetjes wordt gezien, dan dat er van echte spike vorming sprake is (f 44, 49).

In tegenstelling tot de NH groepen zagen we nu duidelijk interpositie van uitlopers van mesangiale cellen tussen endotheel en GBM (f 46, 48). Dit verschijnsel wordt in verband gebracht met de afvoer van filtratie residuen uit de GBM door de mesangiale cel. Reden waarom deze interpositie wel in de imuran-vooraf en imuran-gelijk groepen werd gevonden en niet in de NH, kan berusten op het feit dat in beide imuran groepen nog steeds immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna werden aangetroffen die gemakkelijker bereikbaar zijn voor uitlopers van mesangiale cellen. Het is opvallend dat daarbij een excessieve aanmaak van mesangiale matrix in deze groepen achterwege blijft, zoals ze wel bij de NH werd waargenomen. Dit kan berusten op het feit dat het mesangium nu niet tekort schiet bij de afvoer van filtratie residuen uit de GBM, doordat niet alleen de immuuncomplex aggregaten kleiner zijn, doch ook nog in de lamina rara interna zijn gelokaliseerd. De afvoer van immuuncomplex aggregaten door het mesangium wordt gesuggereerd door het feit dat na twee dagen met name langs het mesangium immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna worden gezien, soms direkt tegen het mesangium aan (f 37), terwijl ook na negentig dagen aggregaten direkt tegen het mesangium aan kunnen worden gezien (f 45).

Evenals de duidelijke verschillen in elektronen microscopie t.o.v. de NH werden verschillen aangetoond in de proteinurie. In beide imuran groepen werd gedurende vrijwel de hele proefperiode een significant lagere proteinurie gevonden dan in de NH (grafiek V, VI, pg. 76, 77). Dit kan berusten op het feit dat de GBM minder werd beschadigd of doordat de afzettingen van de immuuncomplex aggregaten kleiner zijn tengevolge van het feit dat de autologe fase althans gedeeltelijk werd onderdrukt en/of omdat een gedeelte van de gevormde aggregaten vanuit de lamina rara interna werden afgevoerd via het mesangiale gebied.

Door het uitblijven van proteinurie werd hier ook niet of nauwelijks fusie van epitheelvoetjes waargenomen.

De boven beschreven effecten van imuran wanneer voor of tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis toegediend bleken minder duidelijk te zijn wanneer imuran werd toegediend tien dagen na het opwekken van de immuuncomplex glomerulonefritis.

Met licht microscopie en immunofluorescentie werden evenals in de vorige groepen, die imuran kregen toegediend, geen verschillen aangetoond. Nu bleek echter ook het elektronen microscopisch beeld nauwelijks verschillen te tonen met de NH. De afgezette immuuncomplex aggregaten waren veel groter dan in de groepen die imuran eerder kregen toegediend, hoewel ze in grootte nog wel iets achter bleven t.o.v. de NH. Een passage belemmering is nu veel minder duidelijk. Alleen na veertien dagen kan nog sporadisch een aggregaat in de lamina rara interna worden gezien (f 51), terwijl na dertig dagen nog slechts een enkel aggregaat in de lamina densa wordt aangetroffen (f 52). In deze groep van imuran-na kan duidelijk spike vorming waargenomen worden (f 53, 55), terwijl de GBM onregelmatig is verdikt (f 52, 53, 55) en sterk kronkelend verloopt (f 54). Tevens zien we fusie van epitheelvoetjes optreden. Interpositie van mesangium tussen endotheel en GBM kan ook in de imuran-na groep worden aangetoond. Dit is te begrijpen aangezien na veertien dagen nog immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna werden aangetoond (f 51). De interpositie na negentig dagen (f 54) bij afwezigheid van immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna, is mogelijk een restverschijnsel van hetgeen na veertien dagen werd waargenomen. Gezien het voorgaande zou het geringe verschil tussen de NH en imuran-na groep een gevolg kunnen zijn van een sterk verminderde invloed van imuran op de autologe fase, waardoor de grootte en samenstelling van de immuuncomplex aggregaten beter vergelijkbaar zijn met die uit de NH.

Het verloop van de proteinurie in deze groep toont nu geen enkel verschil meer t.o.v. de NH (grafiek VII, pg. 78). Hierdoor kan de waargenomen fusie van epitheelvoetjes in deze groep eveneens verklaard worden.

Het geneesmiddel imuran blijkt dus bij deze immuuncomplex glomerulonefritis alleen dan effectief te zijn wanneer het geneesmiddel vier dagen voor of tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis wordt toegediend, waardoor kennelijk de autologe fase duidelijk minder heftig is. Wanneer het geneesmiddel tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis wordt gegeven, wanneer we mogen aannemen dat de autologe fase reeds is begonnen, heeft het geneesmiddel nauwelijks effect meer.

III. Endoxan

Over het algemeen tonen de endoxan groepen overeenkomst met de imuran groepen. Ook hier worden de groepen die endoxan kregen toegediend vier dagen voor en tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis tegelijk besproken, aangezien ze t.o.v. elkaar geen noemenswaardige verschillen tonen.

In principe zijn ook hier de afgezette immuuncomplex aggregaten kleiner dan in de NH, terwijl eveneens een vertraagde passage door de GBM aantoonbaar

is, gezien het feit dat aggregaten ook na negentig dagen nog in de lamina rara interna en lamina densa kunnen worden aangetoond (f 58, 59, 60, 61). Toch zijn de verschillen tussen de NH en de endoxan-vooraf en endoxan-gelijk groepen minder groot dan tussen de NH en imuran groepen. Met name zijn de immuuncomplex aggregaten in de endoxan groepen groter dan in de imuran groepen. Waarschijnlijk juist door die grotere immuuncomplex aggregaten wordt een onregelmatige GBM gezien en kan meer spike vorming worden aangetoond (f 61).

Fusie van epitheelvoetjes wordt niet gezien, waarschijnlijk omdat in deze groepen, zoals vermeld in Hfdst. VI, geen proteinurie verhoging optrad.

Interpositie van het mesangium werd wel gezien, hetgeen mogelijk correleert met het aanwezig zijn van immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna.

Opmerkelijk is, dat hoewel de grootte van de immuuncomplexen in de endoxan groepen minder verschilde van de NH dan de imuran-vooraf en imuran-gelijk groepen t.o.v. de NH met de immunofluorescentie een verminderde afzetting van ratten IgG kon worden aangetoond (f 57).

De bovengenoemde verschillen met de NH groep waren veel minder duidelijk aanwezig in de groep die endoxan tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis kreeg toegediend. De afzettingen in de GBM waren groter en de onregelmatigheid van de GBM was na negentig dagen meer uitgesproken dan in de andere endoxan groepen (f 65, 66). Hier was nog wel mesangiale interpositie na negentig dagen waarneembaar, mogelijk nog in verband met de na dertig dagen gevonden afzettingen in de lamina rara interna. Hoewel na dertig dagen nog wel enige vermindering van ratten IgG afzetting t.o.v. de NH werd waargenomen (f 63), was dit verschil na negentig dagen verdwenen.

Evenals bij de imuran groepen is het effect van endoxan bij toediening voor of gelijktijd met het opwekken van de immuuncomplex glomerulonefritis duidelijker dan wanneer tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis met endoxan toediening wordt gestart.

IV. Indocid

Hoewel het geneesmiddel indocid een gunstige invloed lijkt te hebben op de proteinurie bij een aantal menselijke nieraandoeningen, is het effect ervan nooit uitvoerig bestudeerd in een experimenteel model.

In de bespreking hier zullen de groepen die indocid voor en tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis kregen toegediend, tezamen worden besproken aangezien ze onderling geen of nauwelijks verschil tonen.

Licht microscopisch werden geen afwijkingen gezien in vergelijking met de NH.

In de immunofluorescentie microscopie werden wel verschillen gezien. Hoewel het beeld na twee dagen van beide groepen identiek was met de NH, werd in de volgende groepen een duidelijke verminderde afzetting van het ingespoten konijnen IgG langs de GBM gezien (f 71, 77); er werden minder fluorescerende granulae per glomerulus gezien. De afzetting van ratten IgG was echter in alle groepen gelijk aan die van de NH (f 72, 78). De verminderde afzetting van konijnen IgG langs de GBM zou mogelijk verklaard kunnen worden uit het feit dat een antiflogisticum als indocid de opname van het ingespoten konijnen IgG

uit de peritoneaalholte van het dier nadelig beïnvloedt. Hierdoor zouden minder immuuncomplexen gevormd kunnen worden, waarna de afzettingen per glomerulus eveneens geringer zouden zijn.

Anderzijds zou het mogelijk zijn, dat door een vertraagde passage van de immuuncomplex aggregaten door de GBM deze in de lamina rara interna blijven liggen, vanwaar ze versneld worden afgevoerd (WALKER 134). Niet verklaard is dan echter waarom de afzetting van ratten IgG zoals aangetoond in de autologe fase niet verschilt van die in de NH. Theoretisch blijft de mogelijkheid, dat de afzetting van ratten IgG in de GBM een onderdeel is van afgezette immuuncomplexen, waarbij het Fx₁A en auto-antilichamen van de rat zelf tegen dit antigeen een rol spelen (zie blz. 45). In overeenstemming hiermee is het feit dat de afzettingen van C' vergelijkbaar zijn met die van de NH.

Ook elektronen microscopisch worden duidelijke verschillen gezien tussen de NH en de groepen die indocid vooraf en tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis kregen toegediend. Als belangrijkste verschil valt de vertraagde passage van immuuncomplex aggregaten door de GBM op. Na twee dagen worden meer immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna gezien dan in de NH, vooral langs het mesangium (f 67). Dit komt ook naar voren bij het vervolgen van de glomerulonefritis, aangezien na dertig dagen en na negentig dagen (f 69, 70, 73, 80) nog steeds immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna kunnen worden aangetoond, terwijl het aantal afzettingen in de lamina densa eveneens groter is dan bij de NH. Het aantal afzettingen in de lamina rara externa lijkt iets achter te blijven t.o.v. de NH, terwijl ook de grootte van de afzettingen in de indocid groepen duidelijk achter blijft t.o.v. de NH (f 68). Na dertig dagen zien we langs de kleinere immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa afzetting van GBM substantie, die na negentig dagen resulteert in duidelijke spike vorming (f 74, 79, 80). Ook vinden we een duidelijke verdubbeling van de glomerulaire basaalmembraan (f 75) temidden waarvan soms immuuncomplex aggregaten worden gezien.

Gedurende de gehele proefperiode konden we in de indocid-vooraf en indocid-gelijk groepen interpositie van het mesangium vinden. Dit kan ook nu gecorrigeerd worden met de aanwezigheid van immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna, waarbij het juist in deze groepen steeds opviel, dat de aggregaten soms direkt tegen het mesangium aan lagen, soms zelfs gedeeltelijk door een mesangiale cel werden omgeven (f 67, 70, 80).

De groep die het indocid kreeg toegediend vanaf tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis, toonde in de licht microscopie en in de immunofluorescentie (f 81, 82) geen enkel verschil met de NH.

Elektronen microscopisch zien we na twee dagen nog geen verschil t.o.v. de NH. Na dertig en negentig dagen echter worden wel degelijk verschillen waargenomen. De GBM is reeds na dertig dagen zeer onregelmatig door een sterke spike vorming zoals in geen enkele andere groep werd waargenomen (f 83). Anders dan bij de vorige indocid groepen worden voornamelijk immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa gevonden, met nog een enkel achtergebleven afzetting in de lamina densa (f 83, 84, 85). In de lamina rara interna worden geen afzettingen gezien terwijl mogelijk in relatie hiermee geen interpositie van mesangium kan worden aangetoond.

Het lijkt merkwaardig dat in alle groepen die indocid kregen toegediend een

sterke spike vorming werd waargenomen. In vergelijking met alle andere groepen is er n.l. een discrepantie tussen de hoeveelheid en de grootte van de spikes en grootte van de afzettingen in de lamina rara externa. Tevens valt het op dat er in de indocid-vooraf en indocid-gelijk groepen ook een discrepantie is tussen de aanwezigheid van immuuncomplex aggregaten in de lamina rara interna en de afvoer hiervan door het mesangium. Er is n.l. sprake van een toename van mesangiale matrix, hetgeen eerder geduid werd als een niet kunnen verwerken van de filtratie residuen uit de GBM (FARQUHAR 42). Ter verklaring van deze twee bevindingen zou de volgende hypothese ontwikkeld kunnen worden:

Het is mogelijk dat indocid, als antiflogisticum, de fagocyterende functie van het mesangium remt. Daardoor kan de afvoer van nieuw gevormde GBM via het mesangium (WALKER 134, zie schema III) worden vertraagd, hetgeen spike vorming en verdubbeling van de GBM in de hand zou kunnen werken. Een extra factor hierbij kan een verhoogde synthese van GBM zijn, die door DAHA (29) werd gevonden in een ander experimenteel model onder invloed van indocid medicatie. De gevonden vertraagde passage in de indocid groepen t.o.v. de NH zou kunnen samenhangen met een hypothetische invloed van indocid op de doorgankelijkheid van de GBM.

D. Samenvatting en conclusie

De hier beschreven immuuncomplex glomerulonefritis toont een histologisch beeld, dat sterk doet denken aan het beeld zoals beschreven bij de autologe immuuncomplex glomerulonefritis naar het model van HEYMANN (HEYMANN 58, ALOUSI 2). Wel zijn er duidelijke kwantitatieve verschillen, die berusten op het feit dat we slechts een beperkte hoeveelheid heteroloog konijnen IgG toedienden, teneinde een geringe en reproduceerbare afzetting van immuuncomplexen in de GBM te verkrijgen, zodat de invloed van geneesmiddelen op deze afzetting beter beoordeeld zou kunnen worden.

Uit de studie bleek duidelijk, dat de immuunsuppressiva endoxan en imuran, mits toegediend voor of tegelijkertijd met het opwekken van de complex glomerulonefritis, duidelijk invloed hadden op de afzetting van deze complexen. Over het algemeen bleven de immuuncomplex aggregaten kleiner dan in de NH groep en was er duidelijk sprake van een vertraagde passage door de GBM. Door deze vertraagde passage bleven de immuuncomplex aggregaten langer zichtbaar in de lamina rara interna. Door de ligging in de lamina rara interna kunnen de immuuncomplexen waarschijnlijk sneller worden afgevoerd naar het mesangium (WALKER 134, schema III) of kunnen ze ter plaatse door interpositie van mesangiale cellen worden gefagocyteerd. Door de verminderde afzetting van kleinere immuuncomplex aggregaten waren ook de veranderingen aan de GBM minder uitgesproken dan in de NH groep. Deze bevindingen waren duidelijker bij imuran dan bij endoxan. De beïnvloeding van grootte van afzettingen van immuuncomplexen in de GBM was duidelijk minder sterk wanneer de immuunsuppressiva werden toegediend tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis, op een moment dat we er zeker van konden zijn dat de autologe fase reeds was begonnen. In deze groepen werden veel minder verschillen gezien met de

NH, zij het dan dat ook hier na negentig dagen interpositie van mesangiale cellen werd gezien, mogelijk ook in deze groepen gecorreleerd met iets vertraagde passage van immuuncomplex aggregaten door de GBM.

Het geneesmiddel indocid werd gebruikt, omdat recent uit de menselijke pathologie is gebleken dat dit geneesmiddel soms een gunstig effect heeft op proteinurie. In ons model kon helaas het effect op de proteinurie niet worden nagegaan, aangezien na het toedienen van IgG van „boeren” konijnen geen proteinurie optrad. Wel werden verschillen in het morfologisch beeld gevonden t.o.v. de NH. Deze verschillen bestonden voornamelijk uit een duidelijk vertraagde passage van immuuncomplex aggregaten door de GBM, vooral in de groepen die indocid voor of tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis kregen toegediend. Hierbij bleven de gevormde immuuncomplex aggregaten eveneens kleiner. Met name in de indocid-vooraf en indocid-gelijk groepen waren meer immuuncomplex aggregaten in het mesangium gelegen. Een versnelde afvoer van immuuncomplex aggregaten leek minder waarschijnlijk op grond van de toename van mesangiale matrix. Tevens viel het op dat in alle groepen die indocid kregen toegediend de GBM, ondanks de geringere afzetting van immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa, onregelmatiger was. Met name viel de sterkere spike vorming in deze groepen op.

Op hypothetische gronden wordt verondersteld dat deze beide bevindingen een gevolg zouden kunnen zijn van een geremde fagocytose van het mesangium onder invloed van het antiflogisticum indocid. De sterkere spike vorming zou mede veroorzaakt kunnen worden door een verhoogde GBM synthese bij de rat onder invloed van indocid, zoals door DAHA (29) werd gevonden.

E. Conclusie voor de menselijke pathologie

Het is duidelijk dat patiënten, lijdende aan een glomerulonefritis over het algemeen pas ter behandeling komen als reeds immuuncomplexen zijn afgezet in de GBM. De behandeling in de menselijke pathologie zal er dus op gericht moeten zijn nieuwvorming van immuuncomplexen in het lichaam en de afzetting daarvan in de GBM tegen te gaan.

Uit onze studie is gebleken, dat de immuunsuppressiva hiervoor in aanmerking kunnen komen; zowel imuran als endoxan zijn n.l. in staat om, wanneer tijdig toegediend, de autologe fase in ons model af te zwakken. Kennelijk wordt de immuunreactie van het proefdier tegen het bij hem ingespoten heterologe konijnen IgG geremd, waardoor ratten IgG in mindere mate zal worden afgezet in de reeds aanwezige immuuncomplexen. Wanneer de autologe fase echter reeds in gang was gezet, bleek dat de toegediende immuunsuppressiva nauwelijks iets konden veranderen aan de afgezette immuuncomplex aggregaten in de GBM en aan de reactie van GBM op deze afzettingen.

De behandeling met immuunsuppressiva zou van belang kunnen zijn bij bepaalde vormen van chronische complex glomerulonefritis in de menselijke pathologie, waarbij de indruk bestaat dat steeds nieuwe immuuncomplexen worden gevormd en in de GBM worden afgezet.

Bij indocid bleek er een vertraagde passage van immuuncomplex (aggregaten) door de GBM te bestaan. Daarnaast echter werden meer dan in andere groepen onregelmatigheden in de GBM gezien, met name spike vorming. De langs het mesangium gevonden immuuncomplex aggregaten in de met indocid behandelde dieren, suggereren een actieve rol van het mesangium. We moeten echter rekening houden met een nadelige invloed van indocid op fagocytose in het algemeen en derhalve ook op de fagocyterende functie van het mesangium. In ons model zou dit kunnen blijken uit de gevonden toename van mesangiale matrix.

Derhalve lijkt indocid op grond van de hier vermelde gegevens bij een immuuncomplex glomerulonefritis, waar van een voortdurend aanbod van immuuncomplexen sprake is, een minder geschikte therapie. In de menselijke pathologie wordt zij als zodanig ook niet gebruikt.

Tot slot bleek uit onze studie, dat het geneesmiddel prednison in de door ons toegepaste dosering, wanneer ook toegediend, geen enkel effect had op de vorming en afzetting van immuuncomplex aggregaten in de GBM.

Uit de publikatie van MUKHERJEE (95) blijkt, dat zij een positief effect vindt van een combinatie therapie van prednison en immuunsuppressiva. Het zou derhalve zinvol zijn om het effect van een combinatie therapie nog eens in een experimenteel model te onderzoeken.

SAMENVATTING

HOOFDSTUK I geeft een korte historische schets van de ontwikkeling van het onderzoek naar — en van het inzicht in — glomerulaire pathologie bij mens en dier. Als doel van het eigen onderzoek wordt vermeld:

„De bestudering van de invloed van enkele geneesmiddelen op het „natuurlijke” beloop (NH) van twee modellen van experimentele glomerulonefritis”.

HOOFDSTUK II geeft een overzicht van de diverse vormen van experimentele glomerulonefritis. In de inleiding die wordt gegeven, worden twee hoofdgroepen onderscheiden, n.l.:

I. experimentele glomerulonefritis op basis van antilichamen tegen antigenen uit de GBM en

II. experimentele glomerulonefritiden veroorzaakt door oplosbare circulerende immuuncomplexen, die worden afgezet in de GBM.

De eerste vorm laat met immuno-fluorescentie een hechting van het antilichaam aan de GBM zien in een lineair patroon, de tweede toont een afzetting van immuuncomplexen langs de GBM in een granulair patroon.

In beide hoofdgroepen is een onderverdeling te maken door onderscheid te maken in participatie van autologe en heterologe antilichamen. In het laatste geval verloopt de glomerulonefritis in twee fasen: een eerste, heterologe fase, waarin het heterologe antilichaam of direkt, of als onderdeel van een immuuncomplex in de GBM wordt afgezet en een tweede, autologe fase, waarin het proefdier zelf antilichamen maakt tegen het toegediende heterologe antilichaam.

Aandacht wordt besteed aan de moeilijkheden die rijzen bij het onderling vergelijken van experimentele modellen. Ook het vergelijken van experimentele modellen met de menselijke nierpathologie is slechts in beperkte mate mogelijk. HOOFDSTUK III geeft een kort, summier overzicht van het effect van enkele geneesmiddelen bij menselijke en experimentele glomerulonefritiden. De gegevens over de resultaten van deze therapie bij de mens, zijn tegenstrijdig en lijken tot nu toe nog niet veelbelovend. Dit geldt eveneens voor de, overigens nog zeer beperkte, gegevens over medicatie bij experimentele glomerulonefritiden.

HOOFDSTUK IV behandelt de produktie en zuivering van gebruikte antilichamen en antigenen. De gebruikte technieken voor histologie en immuno-histologie op licht microscopisch- en ultrastructureel-niveau worden vermeld.

Vrouwelijke Wistar ratten werden als proefdier gebruikt. Het effect van vier geneesmiddelen op het natuurlijke beloop (NH) werd onderzocht, n.l.:

prednison, als prednison-natrium-succinaat, 0,6 mg/kg

azathioprine (imuran), 5 mg/kg

cyclofosfamide (endoxan), 3 mg/kg

indomethacine (indocid), 4 mg/kg

HOOFDSTUK V behandelt de in dit onderzoek gebruikte modellen.

De door ons opgewekte nefrotoxische glomerulonefritis bleek niet geschikt

voor het bestuderen van geneesmiddelen effect op de NH, doordat de proefdieren binnen zes uur na toediening van het serum dood gingen aan intravasale stolling. Deze intravasale stolling moet beschouwd worden als een onderdeel van deze vorm van nefrotoxische glomerulonefritis.

De door ons gebruikte immuuncomplex glomerulonefritis werd opgewekt door toediening van heterologe(konijnen) antilichamen, gericht tegen Fx₁A, afkomstig uit de tubuluscellen van rattennieren. De heterologe antilichamen vormen met het in het rattenserum circulerende Fx₁A oplosbare immuuncomplexen, die in de GBM van de rat worden afgezet (heterologe fase). De rat reageert op deze afzetting met de productie van antilichamen tegen de in zijn GBM afgezette immuuncomplexen. Hierdoor treedt de autologe fase in (na \pm tien dagen), waardoor ook ratten IgG in de GBM wordt afgezet. Met dit model waren we in staat afzettingen van immuuncomplex aggregaten in de GBM te verkrijgen, geschikt om het effect van geneesmiddelen te bestuderen.

Het effect van geneesmiddelen werd als volgt nagegaan:

Een groep die het geneesmiddel kreeg vanaf vier dagen vóór het opwekken van de glomerulonefritis.

Een groep die het geneesmiddel kreeg vanaf het moment waarop de glomerulonefritis werd opgewekt.

Een groep die vanaf tien dagen na het opwekken van de glomerulonefritis het geneesmiddel kreeg, op een moment waarop verondersteld mocht worden dat de autologe fase in gang was gezet.

De proefdieren werden gedurende negentig dagen vervolgd. HOOFDSTUK VI vermeldt de resultaten. Bij het opwekken van de glomerulonefritis werd van twee serum batches uitgegaan. De groepen waarin het effect van prednison en imuran werd bestudeerd, kregen antilichamen afkomstig van Witte Wener konijnen. De groepen waarin het effect van endoxan en indocid werd bestudeerd, kregen antilichamen van „boeren” konijnen. Hoewel histologisch gezien de NH opgewekt met Witte Wener IgG en met „boeren” konijnen IgG identiek waren, bleef in de laatste groep een aantoonbare proteinurie stijging uit.

Voor een overzicht van de resultaten wat betreft licht microscopie, immunofluorescentie en elektronen microscopie wordt verwezen naar paragraaf C, hoofdstuk VI (pagina 40), waarin de gegevens reeds zijn samengevat. HOOFDSTUK VII bevat een discussie en enkele theoretische beschouwingen over de verkregen experimentele gegevens.

De afzettingen van de immuuncomplexen in de GBM bij de NH passeren met een lichte vertraging de lamina densa, om vervolgens in de lamina rara externa te blijven liggen, aanvankelijk in de slit pores. Door voortgaande afzetting van immuuncomplexen groeien deze afzettingen uit tot grote aggregaten, die zich tot onder de epitheelvoetjes gaan uitstrekken.

Nieuwe aanmaak van GBM substantie door de epitheelcellen geeft aanleiding tot de vorming van spikes, terwijl door afzetting van GBM substantie boven de immuuncomplex aggregaten deze langzamerhand van het epitheel lijken te worden „weggedrukt” en tenslotte geheel door GBM omgeven worden. De in dit model gevonden spike vorming hangt waarschijnlijk samen met de aard van de afgezette immuuncomplexen, vooral van het daarin aanwezige autologe-antigeen, het Fx₁A.

Het mesangium toont aanmaak van matrix, hetgeen een uiting kan zijn van het feit dat het mesangium hier tekort schiet bij het opruimen van filtratie residuen uit de GBM, mogelijk juist omdat in dit geval de residuen (de immuuncomplex aggregaten) in de lamina rara externa zijn gelegen.

De blijvende proteinurie stijging die in de glomerulonefritis opgewekt met IgG van Witte Wener konijnen optrad, moet gezien worden als een gevolg van een beschadiging van de GBM tengevolge van in immuuncomplex aggregaten gebonden C'.

Bij het bestuderen van het geneesmiddelen effect blijkt dat prednison, wanneer ook toegediend, geen invloed heeft op het beloop van de glomerulonefritis of de hier bij gevonden proteinurie.

De immuunsuppressiva imuran en endoxan, blijken, indien vooraf of tegelijkertijd met het opwekken van de glomerulonefritis gegeven, wel effect te hebben. De immuuncomplex aggregaten blijven kleiner, vermoedelijk door een gedeeltelijke onderdrukking van de autologe fase, waardoor minder ratten IgG in de aggregaten wordt afgezet. Mogelijk dat de hierdoor veranderde samenstelling ook de reden is waarom de aggregaten langzamer de GBM passeren dan in de NH. In deze groepen zien we duidelijk interpositie van het mesangium tussen endotheel en GBM, hetgeen als uiting wordt gezien van een verhoogde activiteit van het mesangium om de in de lamina rara interna gelegen aggregaten op te ruimen. Dat het mesangium de aggregaten goed kan verwerken hangt mogelijk ook samen met de veranderde samenstelling van de aggregaten.

Het effect van genoemde immuunsuppressiva na tien dagen gegeven is zeer gering.

Bij medicatie met indocid wordt een duidelijk vertraagde passage van de immuuncomplexen door de GBM gezien. Toch wordt er juist in deze groepen een versterkte spike vorming waargenomen. Hiernaast blijkt er een verhoogde matrix vorming op te treden, hoewel er aggregaten in de lamina interna liggen, die in principe makkelijk zouden kunnen worden afgevoerd. Dit duidt op een onvoldoende verwerking van de aangeboden aggregaten.

De spike vorming en de matrix toename van het mesangium zouden een gevolg kunnen zijn van een door indocid geremde fagocytose van het mesangium.

Gezien de resultaten van dit onderzoek lijkt de toepassing van immuunsuppressiva in de menselijke pathologie mogelijkheden te bieden met betrekking tot nieuwvorming en afzetting van immuuncomplexen bij bepaalde vormen van chronische glomerulonefritis.

SUMMARY

CHAPTER I gives a short historical outline of the development of the research into and the insight of glomerular pathology in man and animal. The object of our research was:

„The study of the effect of some drugs on the natural history (NH) of two models of experimental glomerulonephritis (EGN).

CHAPTER II gives a summary of the different types of EGN. The EGN has been divided in two main types:

I. EGN caused by antibodies against antigens from the glomerular basement membrane (GBM).

II. EGN caused by soluble circulating immune complexes, forming deposits in the GBM.

With immunofluorescence the first type shows a linear pattern of antibody binding in the GBM, whilst the second type shows a granular pattern in the GBM, caused by the deposits of immune complexes.

These two main types can be subdivided by discerning the participation of autologous and heterologous antibodies respectively. In the last case the glomerulonephritis runs a course in two phases: at first a heterologous phase in which the heterologous antibody is deposited in the GBM either directly, or as part of an immune complex. In the second, autologous, phase the experimental animal itself produces antibodies against the heterologous antibodies.

Attention was paid to the difficulties which arise when comparing the experimental models. Also the comparing of experimental models with human renal pathology is possible only to a limited extent.

CHAPTER III gives a brief outline of the effects of some drugs in human and experimental glomerulonephritis. The reports of the results of therapy in human pathology seem contradictory and have not been very promising up till now. This also applies to the limited data about drugs in experimental glomerulonephritis.

CHAPTER IV deals with the production and isolation of antibodies and antigens applied. The techniques used for histology and immunohistology on microscopical and ultrastructural level are mentioned.

Female Wistar rats were used as experimental animals.

The effects of four drugs on the NH were investigated, notably:
prednison-sodium-succinate, 0,6 mg/kg
azathioprine, 5 mg/kg
cyclophosphamide, 3 mg/kg
indomethacine, 4 mg/kg.

CHAPTER V deals with the models, as used in this investigation.

The nephrotoxic glomerulonephritis which was induced, was not suitable for the study of drug effects on the NH, as the experimental animals succumbed to

intravascular clotting, six hours after the administration of serum. This intravascular clotting must be considered as part of this type of nephrotoxic glomerulonephritis.

The immune complex glomerulonephritis as used, was induced by administration of heterologous rabbit antibodies against Fx₁A, derived from rat tubulus cells. The heterologous antibodies form, together with the Fx₁A circulating in the rat serum, soluble immune complexes, which are deposited in the GBM of the rat (heterologous phase). The rat reacts upon these deposits by producing antibodies against the immune complexes in its GBM. With this event the autologous phase is introduced (after about ten days), characterized by the deposition of rat IgG in the GBM. With this model we were able to attain deposits of immune complex aggregates in the GBM, which were suitable for studying the effect of drugs.

The effects of drugs were investigated as follows:

The first group was given the drug from the fourth day before the induction of glomerulonephritis.

A second group was given the drug from the moment that glomerulonephritis was induced.

A third group was given the drug from the tenth day after the induction of glomerulonephritis, at a time that the autologous phase had probably started.

The experimental animals were observed for 90 days.

CHAPTER VI shows the results. When inducing glomerulonephritis we started with two batches of serum. The groups in which the effects of prednison and azathioprine were studied, were given antibodies of Witte Wener rabbits. The groups in which the effects of cyclophosphamide and indomethacine were studied, were given antibodies of „boeren” rabbits. Although histologically seen the NH induced by Witte Wener' IgG and „boeren” rabbit IgG was identical, the latter group did not show a demonstrable increase of proteinuria.

Light microscopy: Here one sees at first in the NH a slight swelling of epithelium and mesangium which has completely disappeared after ten days. From the thirtieth day one sees a broadening of the mesangium plus an increase of PAS/silver positive substance. The GBM starts wrinkling slightly and becomes irregular in thickness. Other light microscopical abnormalities were not shown.

The light microscopy of the groups, which received drugs, could not be discerned from the NH at all.

Fluorescence microscopy: Here an identical, slight deposit of rabbit IgG and Complement (C') can be seen in all groups after two days.

In the NH the deposition of rabbit IgG appears to reach its maximum after ten days. This level of fluorescence remains constant during the whole experimental period. The deposition of C' also reaches its maximum after ten days and does not diminish distinctly after this. The deposition of rat IgG is clearly visible after ten days, reaches its maximum after thirty days and does not decrease after this.

The pattern of fluorescence is continually the same; partly fine, partly coarse granular deposits in the GBM.

Prednison shows in the immune fluorescence no difference in any of the groups, in comparison with the NH.

In the groups receiving azathioprine before and at the same time the deposi-

tion of rabbit IgG was at first less pronounced than in the NH (after ten days). This difference could not be discerned in the following groups.

The groups receiving azathioprine afterwards showed no difference in comparison with the NH.

In the groups receiving cyclophosphamide a deposition of rabbit IgG and C' was seen which was completely identical with that of the NH. The deposition of rat IgG appeared retarded. The group receiving cyclophosphamide afterwards showed a delayed appearance of rat IgG deposition only after thirty days. In this group there was no difference discernable after 90 days in comparison with the NH.

In the groups receiving indomethacine before and at the same time the deposition of rabbit IgG is less pronounced, in comparison with the NH, whilst the deposition of C' and rat IgG is exactly comparable with that of the NH. This difference of rabbit IgG deposition in comparison with the NH is not present in the group receiving indomethacine afterwards.

Proteinuria: As far as this is concerned I refer to the graphics I to VII, on pages 72 t/m 78.

Electron microscopy: (see diagram III, chapter VI, page 42).

The morphology of the NH is identical to that found in alle prednison groups. Thus these can be discussed together.

After two days one sees small immune complex aggregates (COAG) in the lamina densa (ld). A few aggregates are situated in the lamina rara externa (lre) and then mainly in the slit pores (sp). After thirty days the immune complex aggregates are much bigger, whilst they are now all situated in the lamina rara externa. The GBM is thickened irregularly. The onset of spike formation can be seen and there is a fusion of the epithelial foot processes. After 90 days large immune complex aggregates can be seen in the lamina rara externa. A pronounced spike formation has appeared. Some aggregates are completely enveloped in the GBM substance. The GBM is irregularly thickened and there is fusion of the foot processes. There is an increase of mesangial matrix.

The groups receiving azathioprine before and at the same time do not show any difference between each other. After two days the morphology is nearly the same as that of the NH, although here aggregates are found in the lamina rara interna (lri) as well. After thirty days however smaller immune complex aggregates can be seen, situated partly in the lamina rara externa. In the lamina densa aggregates are also clearly present, whilst in the lamina rara interna a sporadic aggregate can be found. The GBM is not thickened. The mesangium shows interposition between endothelium and GBM. After 90 days small immune complex aggregates can be seen in the lamina rara externa and the lamina densa. There is only a trace of beginning spike formation. The GBM is not thickened. The mesangium still shows interposition. In this groups we could not see an increase of mesangial matrix.

The group receiving azathioprine afterwards shows more or less the same picture as the NH. After thirty days however one sees a sporadic immune complex aggregate in the lamina densa. The GBM is slightly more regular than in the NH. Also mesangial interposition can be observed. After 90 days the overall picture is hardly different from that of the NH. The immune complex

aggregates are somewhat smaller though and one finds mesangial interposition.

The electron microscopic picture of the groups receiving cyclophosphamide before and at the same time shows the same differences in comparison with the NH as the azathioprine before and at the same time groups, although in cyclophosphamide the differences are possibly less pronounced.

The same can be said of the group receiving cyclophosphamide afterwards, where the difference with the NH morphology was the same as the group receiving azathioprine afterwards.

The group receiving indomethacine before and at the same time can be discussed together, as they show the same picture. Here one still sees after two days many immune complex aggregates in the lamina rara interna. However most aggregates are situated in the lamina densa. After thirty days the aggregates, generally speaking slightly smaller than in the NH, are mainly situated in the lamina densa. Also aggregates can still be observed in the lamina rara interna. A few aggregates are situated in the lamina rara externa. The mesangium shows interposition. There is an increase of mesangial matrix. After 90 days most immune complex aggregates are situated in or against the lamina densa. Only a few aggregates are situated in the lamina rara interna. Along the aggregates that are situated in the lamina rara externa a more pronounced spike formation can be seen than in the NH. One can see the duplication of the GBM appear. The mesangium still shows interposition and increase of mesangial matrix.

The group receiving indomethacine afterwards shows, after thirty days a strong spike formation along the immune complex aggregates situated in the lamina rara externa. This spike formation is more pronounced than in the NH. Also several aggregates can be found in the lamina densa. Due to this the GBM is irregularly thickened. After 90 days most immune complex aggregates are slightly smaller than in the NH. The spike formation is stronger than in the NH, while there are more immune complex aggregates completely enveloped in GBM substance. Here one can still find a few aggregates in the lamina densa. Chapter VII contains a discussion of the experimental information obtained, combined with a few theoretical considerations.

In the NH the deposits of the immune complexes in the GBM pass the lamina densa with a slight delay, to then settle in the lamina rara externa, in the slit pores at first. The continual deposition of immune complexes causes these deposits to grow out into large aggregates, which then extend up to the epithelial foot processes.

Renewed production of GBM substance by the epithelial cells induces the formation of spikes, while the deposition of GBM substance above the immune complex aggregates seems to „push” these aggregates aside and finally envelops them completely. The spike formation as found in this model is probably related to the type of immune complex deposits, especially to their autologous antigen component, the Fx₁A.

The mesangium shows a production of matrix substance, which may be a symptom of the mesangial failure to clear the filtration residues from the GBM, perhaps because of the situation of the residues (the immune complex aggregates) in the lamina rara externa.

The lasting raise of proteinuria which accompanies the glomerulonephritis, induced with IgG of Witte Wener rabbits, must be considered as a result of a lesion of the GBM, due to C' bound in immune complexes.

In studying the effects of drugs, prednison, whenever given, appears to have no influence on the course of the glomerulonephritis, or on the proteinuria found there.

The immunesuppressiva azathioprine and cyclophosphamide do appear to have an effect, if given before or at the same time as the induction of glomerulonephritis. The immune complex aggregates remain smaller, probably due to a partial suppression of the autologous phase. As result less rat IgG is deposited in the aggregates. Possibly the altered composition also brings about a slower passage of the aggregates through the GBM than in the NH. In these groups one clearly sees interposition of mesangium between endothelium and GBM, which is considered to be an indication of increased activity of the mesangium to clear away the aggregates situated in the lamina rara interna. The fact that the mesangium is well able to take on the aggregates is perhaps related to the altered composition of the aggregates.

The effect of the immunesuppressiva mentioned is minimal when given after ten days.

When indomethacine is given, the passage of immune complexes through the GBM is clearly delayed. In these groups an intensified spike formation is observed. Besides this one sees, that even though aggregates are situated in the lamina rara interna, which should easily be able to be transported, matrix formation is still increased. This indicates that the aggregates offered are not digested.

The spike formation and increase of mesangial matrix could be the result of a by indomethacine inhibited phagocytosis of the mesangium.

Considering the results of this investigation, the application of immunesuppressiva in human pathology seems to offer opportunities in relation to the neo-genesis of immune complex deposits in certain types of chronic glomerulonephritis.

LITERATUURLIJST

1. ACKER v. K.J., HOOFT C. (1968); The influence of hormone treatment of the natural evolution of the idiopathic nephrotic syndrome. *Act.Paed.Scand.* **57**, 479
2. ALOUSI M.A., POST R.S., HEYMANN W. (1969); Experimental autoimmune nephrosis in rats. *Am.J.Path.* **54**, 47
3. ANDRES G.A., ACCINNI L., BEISER S.M., CHRISTIAN C.L., CINOTTI G.A., ERLANGER B.F., HSU K.C., SEEGAL B.C. (1970); Localisation of fluorescein labeled antinucleoside antibodies in glomeruli of patients with active systemic lupus erythematosus nephritis. *J.Clin.Invest.*, **49**, 2106
4. ARAKAWA M., KIMMELSTIEL P. (1970); The glomerular nephritis of acute serum sickness. A study using light and electron microscopy. *Am.J.Clin.Path.* **53**, 60
5. ARIEFF A.I., PINGERRA W.F. (1972); Rapidly progressive glomerulonephritis treated with anti-coagulants. *Arch.Int.Med.*, **129**, 77
6. BACARI R.A., VELASQUEZ T., KANTER A., PIRANI C.G., POLLAK V.E. (1968), Rapidly progressive glomerulonephritis (non streptococcal). *Am.J.Int.Med.*, **69**, 463
7. BALIAK T., DRUMMOND K.N. (1972); The effect of anti-coagulation on serum sickness nephritis in rabbits. *Exp.Biol.Med.* **140**, 329
8. BALNER H. (1971); Perspectives of immunosuppression. *Trans. Proc.* **3**, 949
9. BANKS K.L., HENSON J.B., McGUIRE T.C. (1972); Immunologically mediated glomerulonephritis of horses. I.Pathogenesis in persistent infection by equine infectious anemia virus. *Lab.Invest.*, **26**, 701
10. BARABAS, A.Z., NAGI A.H., LENNIGAN R., WOMERSLEY P.A. (1970); The effect of cortison treatment on autologous complex glomerulonephritis in rats. *Brit.J.Exp. Path.*, **51**, 541
11. BARRATT T.M., SOOTHILL J.F. (1970); Controlled trial of cyclofosfamide in steroid sensitive relapsing nephrotic syndrome in childhood. *The Lancet*, II, nr 7671, 479
12. BARRATT T.M., CAMERON J.S., CHANTER C., OGG C.S., SOOTHILL J.F. (1973); Comparitive trial of 2 week and 8 week cyclofosfamide in steroid sensitive relapsing nephrotic syndrome in childhood. *Arch.Dis.Childh.*, **48**, 286
13. BECKER E.L., AUSTEN K.F. (1968); Anaphylaxis. In: *Textbook of Immunopathology.* Miescher P.A. ed. vol I, 81
14. BENSON M.D., COHEN A.S. (1970); Antinuclear antibodies in SLE. Detection with horseradish peroxidase conjugated antibody. *Am.J.Int.Med.*, **73**, 943
15. BIELSCHOWSKY M., HELYER B.J. (1959); Spontaneous haemolytic anaemia in mice of the NZB/B₁ strain. *Proc.Univ.Otaga Med. Sch.*, **37**, 9
16. BOSS J.H., SILBER E., NELKEN D. (1967); Auto-immune renal disease. Development of renal lesions and circulating antibodies in rats, immunized with homologous kidney fractions. *Immunology*, **13**, 167
17. BRIGHT R. (1827); *Reports of Medical Cases.* London: Longmans, vol I
18. BRIGHT R (1836); Cases and observations illustrative for renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine. *Guy Hosp.Rep.* vol I, 338
19. BURCH G.E., SUN S.C. (1968); Viral nephritis. *Am.Heart J.*, **75**, 1
20. BURKHOLDER P.M., MARCHAND A., KRUEGER R.P. (1970); Mixed membranous and proliferative glomerulonephritis. A. correlative light-, immunofluorescence- and electronmicroscopic study. *Lab.Invest.*, **23**, 459
21. CAEY T.P. (1968); Immunosuppression by cyclofosfamide in NZBxNZW mice with LE-nephritis. *Blood*, **32**, 436
22. CAMERON J.S. (1971); Immunosuppressant agents in the treatment of glomerulonephritis. I. Corticosteroid drugs. *J.Roy.Coll.Phycns.Lond.* **5**, 282

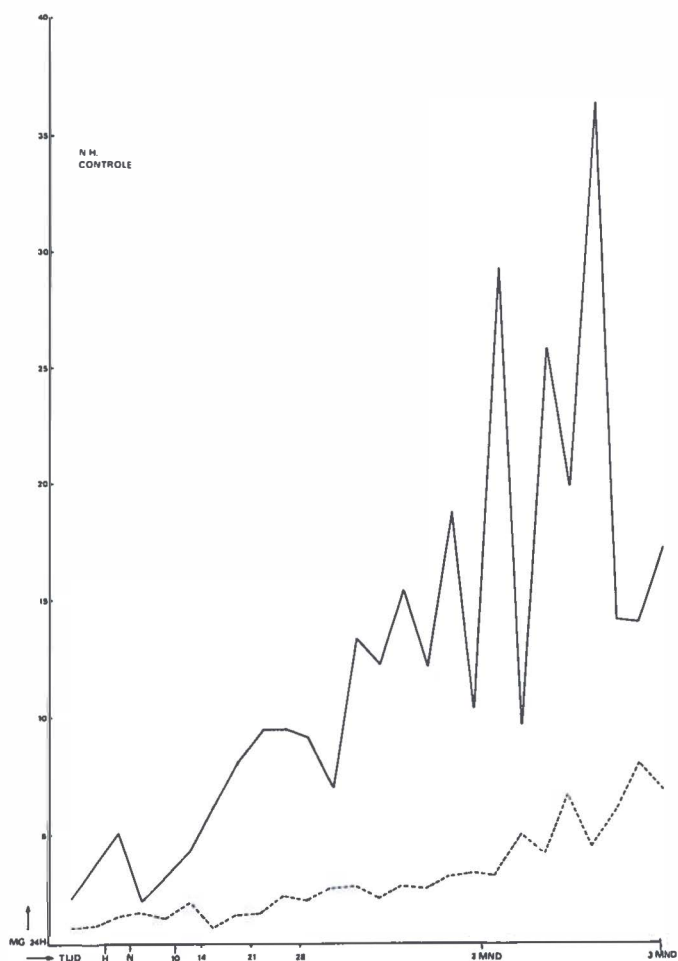
23. CAMERON J.S. (1971); Immunosuppressant agents in the treatment of glomerulonephritis. II. Cytotoxic drugs. *J.Roy.Coll.Phycns.Lond.*, **5**, 301
24. CAMPBELL D.H., GARVEY J.S., CREMER N.E., SUSSDORF D.H. (1970); *Methods in Immunology*. Benjamin inc. ed. NewYork. pg. 189
25. CHEVILLE N.F., MENGELING W.L. (1969); The pathogenesis of chronic hog cholera. Histologic, immunofluorescent and electron microscopic studies. *Lab.Invest.*, **20**, 261
26. CHIN J., McLAINE P.N., DRUMMOND K.N. (1973); A controlled prospective study of cyclofosfamide in relapsing, corticosteroid responsive minimal lesion nephrotic syndrome in childhood. *J.of Paed.* **82**, 607
27. COCHRANE C.G., UNANUE E.R., DIXON F.J. (1965); A role of polymorphnuclear leucocytes and complement in nephrotoxic nephritis. *J.Exp.Med.*, **122**, 99
28. CONTE J., SUE J.M., MIGNON-CONTE M. (1967); Effet antiproteïnurie de l'indomethacine dans les glomérulonephritis. *J.Urol.Néphrol.* **73**, 850
29. DAHA M.R. (1973); *Synthese van glomerulaire basaalmembraan bij ratten*. Proefschrift. Leiden.
30. DIXON F.J., VAZQUEZ J.J., WEIGLE W.O., COCHRANE C.G. (1958); The pathogenesis of serum sickness. *Arch.Path.* **65**, 18
31. DIXON F.J., FELDMAN J.D., VAZQUEZ J.J. (1961); The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J.Exp.Med.* **113**, 899
32. DIXON F.J., COCHRANE C.G. (1970); The pathogenecity of antigen-antibody complexes. *Pathology Annual* vol 5, ed. Sommers S.C.
33. DIXON F.J., OLDSTONE M.B.A., TONIETTI G. (1971); Pathogenesis of immune complex glomerulonephritis of NewZealand mice. *J.Exp.Med.* **134**, 655
34. DONADIO J.V., WAGONER R.D., McDUFFIE F.C. (1972); Treatment of lupus nephritis with prednison and combined prednison and azathioprine. *Ann.Int.Med.* **77**, 829
35. EDGINGTON T.S., GLASSOCK R.J., DIXON F.J. (1967); Autologous immune complex pathogenesis of experimental allergic glomerulonephritis. *Science* **155**, 1432
36. EDGINGTON T.S., GLASSOCK R.J., WATSON J.I., DIXON F.J. (1967) Characterization and isolation of specific epithelial antigens. *J.Immunology*, **99**, 1199
37. EDGINGTON T.S., GLASSOCK R.J., DIXON F.J. (1968); Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen I. Identification and isolation of the pathogenic antigen. *J.Exp.Med.*, **127**, 555
38. ELEMA J.D., KOUDSTAAL JOH., LAMBERTS H.B. (1971); Spontaneous glomerulosclerosis in the rat. *Arch.Path.*, **91**, 418
39. ES v. L.A. (1971); A study of experimental glomerulonephritis in rats. Proefschrift, Leiden.
40. FARQUHAR M.G., PALADE G.E. (1962); Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. Phagocytosis of filtration residues by a distinctive „third” cell. *J. Cell Biol.* **13**, 55
41. FARQUHAR M.G., WISSIG S.L., PALADE G.E. (1961); Glomerular permeability. I. Ferritine transfer across the normal glomerular capillary wall. *J.Exp.Med.* **113**, 47
42. FARQUHAR M.G. (1964); In discussion of electronmicroscopic studies of the diabetic kidney. In; *Small bloodvessel involvement in diabetic kidney*. ed. Siperstein M.D., Colwell A.R., Meyer K., Washington 1964.
43. FEIZI T., GITLIN N (1969); Immune complex disease of the kidney associated with chronic hepatitis and cryoglobulinaemia. *Lancet*, vol II, 873
44. FELTKAMP-VROOM Th.M., BALNER H. (1972); Glomerular basement membrane-reactive antibodies in anti-lymphocyte sera: In vitro and in vivo characteristics. *Eur.J.Immunol.*, **2**, 166
45. FISH A.J., MICHAEL A.F., VERNIER R.L., GOOD R.A. (1966); Acute serum sickness nephritis in the rabbit: An immune deposit disease. *Am.J.Path.* **49**, 997
- 45^a. FISHER E.R., HELLSTRÖM H.R. (1962); Mechanism of proteinuria: functional and ultrastructural correlation of effects of infusion of homologous and heterologous protein (bovine serum albumin) in the rat. *Lab.Invest.*, **11**, 617
46. GERMUTH F.G. (1953); A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. *J.Exp.Med.*, **97**, 257
47. GERMUTH F.G., SENTERFIT L.B., POLLACK A.D. (1967); Immune complex disease I. Experimental acute and chronic glomerulonephritis. *John Hopk.Med.J.* **120**, 225

48. GERMUTH F.G., KELEMEN W.A., POLLACK A.D. (1967); Immune complex disease II. The role of circulatory dynamics and glomerular filtration in the development of experimental glomerulonephritis. *John Hopk.Med.J.* **120**, 252
49. GLASSOCK R.J., EDGINGTON T. S., WATSON J.I., DIXON F.J. (1968); Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen II. The pathogenic mechanism. *J.Exp.Med.*, **127**, 573
50. GRAHAM R.C., KARNOVSKY M.J. (1966); Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidase as protein tracers. *J.Exp.Med.* **124**, 1123
- 50^a. GREIFFER I. (1972); The international study of kidney diseases in children. A scientific approach of therapy through controlled trials. Abstracts V international congress of nephrology Mexico.
51. GRUPE W.E., KAPLAN M.H. (1969); Demonstration of an antibody to proximal tubular antigens in the pathogenesis of experimental autoimmune nephrosis in rats. *J.Lab. Clin.Med.* **74**, 400
52. HACKEL D.B., POUTFOLIO A.G., KINNER T.D. (1950); Experimental nephrotoxic nephritis in the rat treated with ACTH or cortison. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **74**, 458
53. HAWKINS D., COCHRANE C.G. (1968); Glomerular basement membrane damage in immunological glomerulonephritis. *Immunology* **14**, 665
54. HAYSLETT J.P., KASHGARIAN M., COOK C.D., SPARGO B.H. (1972); The effect of azathioprine on lupus glomerulonephritis. *Medicine* **51**, 393
55. HELYER B.J., HOWIE J.B. (1963); Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a crossbred strain of mice. *Nature* **187**, 197
56. HENSON P.M. (1971); Release of biologically active constituents from blood cells and its role in antibody-mediated tissue injury. In: *Prop. in Immunology.* ed. Amos B., Acad.Press NewYork
57. HERDMAN R.C. (1970); Anticoagulants in renal diseases in children. *Am.J.Dis.Children*, **119**, 27
58. HEYMANN W., HACKEL D.B., HARWOOD S., WILSON S.G.F., HUNTER J.L.P. (1959); Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvant and kidney suspensions. *Proc.Soc.Exp.Biol.*, **100**, 660
59. HOEDEMAEKER Ph.J., FEENSTRA K., NIJKEUTER A., ARENDS A. (1972); Ultrastructural localization of heterologous nephrotoxic antibody in the glomerular basement membrane of the rat. *Lab.Invest.* **26**, 610
60. HOROWITZ H.I., DES PREZ R.M., HOOLS E.W. (1962); Effects of bacterial endotoxin on rabbit platelets II. Enhancement of platelet factor 3 activity in vitro and in vivo. *J.Exp.Med.*, **116**, 619
61. KARNOVSKY M.J.A. (1965); Formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J.Cell Biol* **27**, 137a
62. KARNOVSKY M.J.A., VENKATACHALAN M.A., GRAHAM R.C.jr., COTRAN R.S. (1969); Ultrastructural basis of glomerular permeability to macromolecules. *Proc.IV Intern.Congress Nephrology, Stockholm*
63. KAUFMAN D.B., McINTOSH R. (1971); The pathogenesis of the renal lesion in a patient with streptococcal disease, infected ventriculo-atrial shunt, cryoglobulinaemia and nephritis. *Am.J.Med.* **50**, 262
64. KINCAID-SMITH P., SAHER B.M., FEIRLEY K.E. (1968); Anticoagulants in „irreversible“ acute renal failure. *Lancet* vol II, 1360
65. KOFFLER D., PARONETTO F. (1965); Immunofluorescent localization of immunoglobulins, complement and fibrinogen in human diseases. II. Acute, subacute and chronic glomerulonephritis. *J.Clin.Invest.*, **44**, 1665
66. KOFFLER D., SANDSON J., CARR R., KUNKEL H.G. (1969); Immunologic studies concerning the pulmonary lesions in Goodpastures syndrome. *Am.J.Path.*, **54**, 293
67. KOFFLER D., AGNELLO V., THOBURN R., KUNKEL H.G. (1971); Systemic lupus erythematosus; prototype of immune complex nephritis in man. *J.Exp.Med.*, **134**, 1963
68. LACHMAN P.J. (1968); Nephrotic syndrome from penicillamine. *Postgrad.Med.J.*, **44**, suppl. 23
69. LAMBERT P.H., DIXON F.J. (1968); Pathogenesis of glomerulonephritis of NZB/W mice. *J.Exp.Med.*, **127**, 507
- 69^a. LAVER M., KINCAID-SMITH P. (1972); The natural and treated history of patients

- with membranous glomerulonephritis. Abstracts V Intern.Congress of Nephrology, Mexico.
70. LERNER R.A., DIXON F.J. (1966); Transfer of ovine experimental allergic glomerulonephritis with serum. *J.Exp.Med.*, **124**, 431
 71. LERNER R.A., DIXON F.J. (1968); The induction of acute glomerulonephritis in rabbits with soluble antigens isolated from normal homologous and autologous urine. *J.Immunology*, **100**, 1277
 72. LERNER R.A., DIXON F.J., SUN LEE (1968); Spontaneous glomerulonephritis in sheep. II Studies on natural history, occurrence in other species and pathogenesis. *Am.J.Path.*, **53**, 501
 73. LEWIS M.J., LONGHRIDGE L.W., PHILLIPS T.M. (1971); Immunological studies in nephrotic syndrome associated with extra renal malignant disease. *Lancet*, vol II, 134
 74. LINDBERG L.H., VOSTI K.L. (1969); Elution of glomerular bound antibodies in experimental streptococcal glomerulonephritis. *Science*, **166**, 1032
 75. LINDEMANN W. (1900); Sur le mode d'action de certain poisons renaux. *Ann.Inst. Pasteur*, **14**, 49
 76. LINDER F.J., EDGINGTON T.S. (1971); New plasma auto-antigen and its role in autoimmune disease of NZB mice. *Nature New.Biol.*, **234**, 279
 77. LIPPMAN R.W., MARTI H.U., JACOBSE E.E., CAMPBELL D.H. (1954); Nephrotoxic globulin nephritis. V Effects of adrenal steroid administration or adrenalectomy. *Arch.Path.*, **57**, 405
 78. LONGCOPE W.T. (1913); The production of experimental nephritis by repeated protein intoxication. *J.Exp.Med.*, **18**, 678
 79. MARKHAM, R.U., SUTHERLAND J.C., CIRUINO F.F., DRAKE W.P., MARDINEY M.R. (1972); Immune complex localized in the renal glomeruli of AKR mice: The presence of MuLVgs-1 and C type RNA tumor virus gs-3 determinants. *Rev.Eur. Clin.Biol.*, **17**, 690
 80. MARMONT A.M., ROSSI F., DAMASIO E. (1965); Indomethacin in the treatment of rheumatic and non-rheumatic diseases, with special reference to systemic lupus erythematosus. Intern. Symp. on non-steroidal anti-inflammatory drugs. N.Y. Excerpt. Med.Found. pg 363
 81. MASUGI M. (1933); Ueber das Wesen der spezifischen Veränderungen der Nier und der Leber durch das Nephrotoxin bzw. das Hepatotoxin. *Beitr.Path.Anat.* **91**, 82
 82. MASUGI M. (1933); Über die experimentelle Glomerulonephritis durch das spezifische Antinierenserum. *Beitr.Path.Anat.*, **92**, 429
 83. MASUGI M. (1934); Über die allergische Gewebsreaktion der Nier. Zugleich ein experimenteller Beitrag zur pathogenese der diffusen Glomerulonephritis und der Periarteritis nodosa. *Virch.Arch.*, **293**, 615
 84. McCAUGHEY W.T.E., THOMAS B.J. (1962); Pulmonary hemorrhage and glomerulonephritis. The relation of pulmonary hemorrhage to certain types of glomerular lesions. *Am.J.Clin.Path.*, **38**, 577
 85. McCLUSKEY R.T., VASSALLI P., GALLO G., BALDWIN D.S. (1966); An immunofluorescent study of pathogenic mechanisms in glomerular disease. *New.Eng.J.Med.*, **274**, 695
 86. McCLUSKEY R.T., VASSALLI P., GALLO G., BALDWIN D.S. (1967); Pathogenic role of the coagulation process in experimental and human glomerulonephritis. In: *Acute Glomerulonephritis*, ed. Mercoff J., Boston. pg 145
 87. McINTOSH R.M., KAUFMAN D.B., GRISWOLD W., URISAR R., SMITH F.G.jr, VERNIER R.L. (1972); Azathioprine in glomerulonephritis. *Lancet*, vol II, 1085.
 88. McPHAUL J.J.jr, DIXON F.J. (1970); Characterization of human antiglomerular basement membrane antibodies eluted from glomerulonephritic kidneys. *J.Clin.Invest.*, **49**, 398
 89. MELLORS R.E., SHIRAI T., AOKI T., HUEBNER R.J., KRAWCZYNSKI L. (1971); Wild type gross leukemia virus and the pathogenesis of the glomerulonephritis in NewZealand mice. *J.Exp.Med.*, **133**, 113
 90. MICHAEL A.F., FISH A.J., GOOD R.A. (1967); Glomerular localization and transport of aggregated protein in mice. *Lab.Invest.*, **17**, 14
 91. MICHIELSEN P., VERBERCKMOES R. (1966); Treatment of proteinuria with anti inflammatory drugs. *Abstr.Intern.Congr.Nephrology*, Washington, pg 243

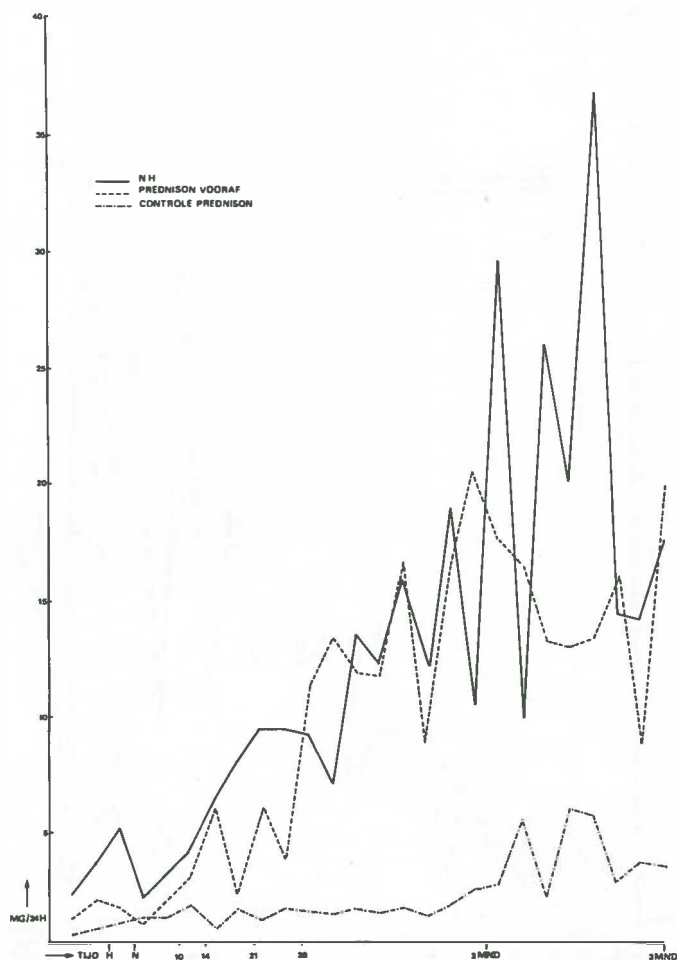
92. MICHELSEN P., LAMBERT P.P. (1967); Effets du traitement par les corticostéroïdes et l'indométhacine sur la protéinurie. *Bull.Soc.Med.Hôp.Paris*, **118**, 217
93. MICHELSEN P., VERBERCKMOES R., DESMET V., HERMERIJCK W. (1969); Evolution histologique des glomérulonephritides prolifératives diffuses traitées par l'indométhacine. *J.Urol.Néphrol.*, **75**, 315
- 93^a. MIHARA H., SAKAI R., HIWASA I., FUJITA Y. (1972); An experiment to treat nephritis through coagulation-fibrinolysis control. *Abstr.V.Intern.Congress Nephrol. Mexico*
94. MISRA R.P., BERMAN L.B. (1972); Studies on glomerular basement membrane. III. Effects of steroid on membrane chemistry and its protein permeability. *Lab.Invest.* **26**, 666
95. MUKHERJEE A.P. (1971); Combined prednisolone, azathioprine and cyclophosphamide treatment for persistent proliferative glomerulonephritis in adults. *Lancet*, vol I, 1350
96. OKUDA R., KAPLAN M.H., CUPPAGE F.E., HEYMANN W. (1965); Deposition of autologous gamma globulins in kidneys of rats with nephrotic renal disease of various etiologies. *J.Lab.Clin.Med.*, **66**, 204
97. OLDSTONE M.B.A., DIXON F.J. (1971); Immune complex disease in chronic viral infections. *J.Clin.Med.*, **134**, 32
98. PORTER D.D., PORTER H.G. (1971); Depositions of immune complexes in the kidneys of mice infected with lactic dehydrogenase virus. *J.Immunol* **106**, 1264
99. PROSKEY A.J., WEATHERBEE L., EASTERLING R.E., GREEN J.A.jr, WELLER J.M. (1970); Goodpasture's syndrome A report of five cases and review of the literature. *Am.J.Med.*, **48**, 162
100. RATNOFF O.D. (1970); The interrelationship of clotting and immunologic mechanisms. In: *Immunobiology*. ed. Good R.A., Fisher D.W. pg 135
101. ROBBINS J., STETSON C.A. (1959); An effect of antigen-antibody interaction on blood coagulation. *J.Exp.Med.*, **109**, 1
102. ROSEN S. (1971); Membranous glomerulonephritis: Current status. *Human Path.*, **2**, 209
103. RUSSELL P.M., HICKS J.D., BURNAT F.M. (1966); Cyclophosphamide treatment of kidney disease in NZBxNZW-F₁ mice. *Lancet*, vol I, 1279
104. SCHICK B. (1907); Nachkrankheiten des Scharlach. *Jb. Kinderheilk.*, **65**, 132
105. SCHUR P.M., MONROE M. (1969); Antibodies to ribonucleic acid in systemic lupus erythematosus. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.*, **63**, 1108
106. SCHWARTZ R., Quoted by Dixon F.J. e.a. (1971); *Progress in Immunology*. ed. Amos B. Acad.Press NY. pg 681
107. SEEGAL B.C., HSU K.C., TOHRENBURG M.S., CHAPEAN M.L. (1962); Studies on the mechanism of experimental nephritis with fluorescein-labeled antibody. II. Localization and persistence of injected rabbit or duck anti-rat-kidney serum during the course of nephritis in rats. *Am.J.Path.*, **41**, 183
108. SEEGAL B.C., ANDRES G.A., HSU R.C., ZABRISKIE C.B. (1965); Studies on the pathogenesis of acute and progressive glomerulonephritis in man by immunofluorescent and immunoferritin techniques. *Fed.Proc.*, **24**, 100
109. SHIBATA S., NAGASAWA T., TAKUMA T., NARUSE T., MIYAKAWA Y. (1966); Isolation and properties of the soluble antigen specific for the production of nephrotoxic glomerulonephritis I. Immunopathological demonstration of the complete antigenicity of the soluble antigen. *Jap.J.Exp.Med.*, **36**, 127
110. SHIGEMATSU H., KOBAYASHI Y. (1971); The development and fate of the immune deposits in the glomerulus during the secondary phase of rat masugi nephritis. *Virch. Arch.B.*, **83**, 95
111. SKINNER M.D., SCHWARTZ R.S. (1972); Immunosuppressive therapy. *New.Eng.J. Med.*, **287**, 281
112. SMITH R.D., AQUINO J. (1971); Viruses and the kidney. *Med.Clin.N.Am.*, **55**, 89
113. SOOTHILL J.F., BARRATT T.M. (1971); Le traitement immunosuppresseur de la glomérulonephrite. *Actualité néphrologique de l'hôpital Necker*.
114. STEBLAY R.W. (1962); Glomerulonephritis induced in sheep by injection of heterologous glomerular basement membrane and Freund's adjuvant. *J.Exp.Med.*, **116**, 253
- 114^a. STRIKER G.E., SMUCKLER E.A. (1970); An ultrastructural study of glomerular basement membrane synthesis. *Am.J.Path.*, **58**, 531

115. SUN S.C., BURCH G.E., SOHAL R.S., CHU K.C. (1967); Coxsackie B₁ viral nephritis in mice and its autoimmune-like phenomena. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **126**, 882
116. SUN S.C., LAI C.H., CHAR S.T., SCHAEFFER B.T. (1971); Evolution of chronic glomerulonephritis induced in mice by echo-9 and coxsackie-B₁ viruses. *J.Path.*, **104**, 53
117. SYLIM V., SPARGO B. (1973); Immunosuppressive treatment of autologous immune complex nephritis in rats. *J.Lab.Clin.Med.*, **81**, 661
118. THE T.H., FELTKAMP T.E.W. (1970); Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. *Immunolgy*, **18**, 865
119. THE T.H., FELTKAMP T.E.W. (1970); Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. II. A reproducible method. *Immunology*, **18**, 875
120. TRIEDMAN R.S., METZGER H., HSU K.C., ROTHENBERG M., SEEGAL B.C., URQUHART A. (1962); Studies of the mechanism of experimental nephritis with fluorescein-labeled antibody. I. Localization and persistence of injected duck anti-rat lung serum during the course of nephritis in rats. *Am.J.Path.*, **41**, 95
121. UNANUE E.R., DIXON F.J. (1964); Experimental glomerulonephritis IV: Participation of complement in nephrotoxic nephritis. *J.Exp.Med.*, **119**, 965
122. UNANUE E.R., DIXON F.J. (1965); Experimental glomerulonephritis V: Studies on the interaction of nephrotoxic antibodies with tissue of the rat. *J.Exp.Med.*, **121**, 697
123. UNANUE E.R., DIXON F.J. (1965); Experimental glomerulonephritis VI: The autologous phase of nephrotoxic serum nephritis. *J.Exp.Med.*, **121**, 715
124. UNANUE E.R., DIXON F.J., SUN LEE (1965); Experimental glomerulonephritis VII: The absence of an auto-immune antikidney response in nephrotoxic serum nephritis. *J.Exp.Med.*, **122**, 565
125. UNANUE E.R., DIXON F.J., SUN LEE (1966); Experimental glomerulonephritis VIII: The in vivo fixation of heterologous nephrotoxic antibodies to and their exchange among tissues of the rat. *Int.Arch.Allergy*, **29**, 140
126. UNANUE E.R., DIXON F.J. (1967); Experimental glomerulonephritis. Immunological events and pathogenetic mechanism. *Adv. in Immunology*, **6**, 1 (NY., Acad.Press)
127. VASSALLI P., McCLUSCKEY R.T. (1964); The pathogenic role of fibrin deposition in immunologically induced glomerulonephritis. *Ann.NY Acad.Sci.*, **116**, 1052
128. VASSALLI P., McCLUSCKEY R.T. (1964); The pathogenic role of the coagulation process in rabbit Masugi nephritis. *Am.J.Path.*, **45**, 653
129. VASSALLI P., McCLUSCKEY R.T. (1971); Rôle du processus de coagulation dans les affections glomérulaires d'origine immunologique. *Act.Néphrol.Hôp.Necker*.
130. VENKATACHALAN M.A., KARNOVSKY M.J., FAHIMI H.D., COTRAN R.S. (1970); An ultrastructural study of glomerular permeability using catalase and peroxidase as tracer proteins. *J.Exp.Med.*, **132**, 1153
131. VERNIER R.L., BIRCH-ANDERSON A. (1962); Studies of the human fetal kidney I. Development of the glomerulus. *J.Pediat.*, **60**, 754
132. VERNIER R.L., MAUER S.M., FISH A.J., MICHAEL A.F. (1971); Les cellules mésangiales dans les glomérulonephrites. *Act.Néphrol.Hôp.Necker*.
133. VOSTI K.L., LINDBERG L.H., KOSCH J.C., RAFFEL S. (1970); Experimental streptococcal glomerulonephritis: Longitudinal study of a laboratory model resembling human post streptococcal glomerulonephritis. *J.Inf.Dis.*, **122**, 249
134. WALKER F. (1973); The origin, turn over and removal of glomerular basement membrane. *J.of Path.*, **110**, 233
135. WARD P.A., KIBUKAMUSOKE J.W. (1969); Evidence for soluble immune complexes in the pathogenesis of glomerulonephritis in quartan malaria. *Lancet*, vol. I, 283
136. WILSON C.B., DIXON F.J., FORTNER J.G., CERILLI G.J. (1971); Glomerular basement membrane reactive antibody in antilymphocyte globulin. *J.Clin.Invest.*, **50**, 1525
137. WILSON C.B., DIXON F.J. (1973); Anti-glomerular basement membrane antibody induced glomerulonephritis. *Kidney Intern.* **3**, 74
138. ZABRISKIE J.B., UTERMÖHLEN V., READ S.E., FISCHETTI V.A. (1973); Streptococcus-related glomerulonephritis. *Kidney Intern.*, **3**, 100
139. ZWEIG S.M., BERRY W., RAPOPORT A., GARVEY B. (1972); Failure of short term heparin therapy to improve renal function. Abstract V Intern.Congres Nephrol. Mexico.



Grafiek I: Proteinurie beloop van de NH van de immuuncomplex glomerulonefritis opgewekt met konijnen IgG van Witte Weners. De grafiek is uitgezet naar de middelste waarde van de eiwit uitscheiding van die 5 ratten, die gedurende de gehele proefperiode van 90 dagen (= 3 mnd) werden vervolgd. De controle beesten ondergingen alleen éézijdige nefrectomie.

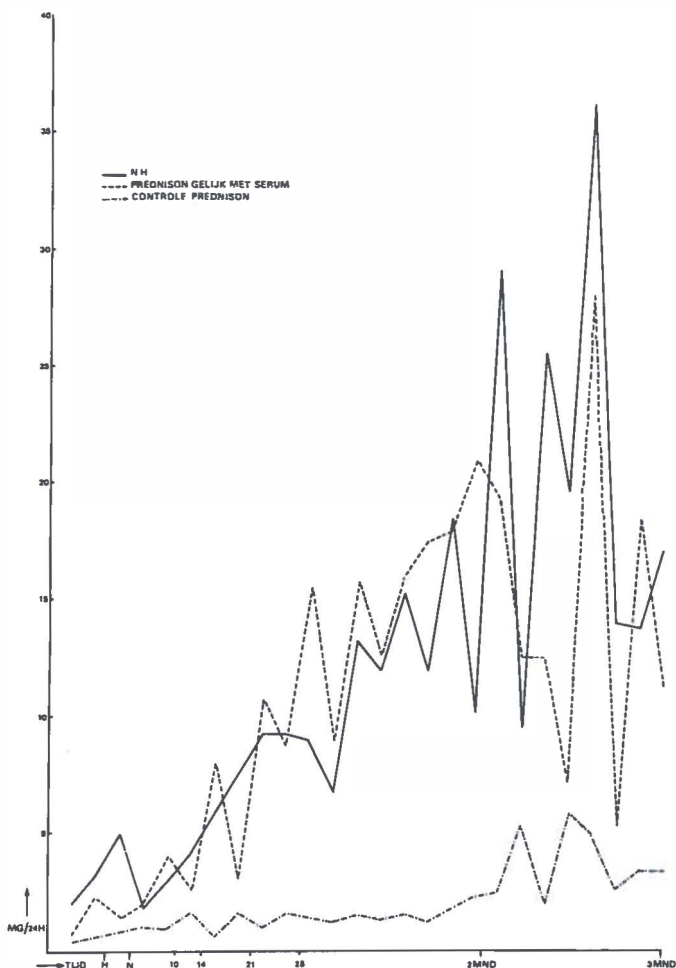
H = tijdstip waarop konijnen IgG werd toegediend. N = tijdstip van nefrectomie.



Grafiek II: Proteinurie beloop van de prednison-vooraf groep vergeleken met de NH en de controle ratten die dagelijks ook prednison kregen toegediend. De grafiek is uitgezet naar de middelste waarde van steeds die 5 ratten, die gedurende de gehele proefperiode van 90 dagen (= 3 mnd) werden vervolgd.

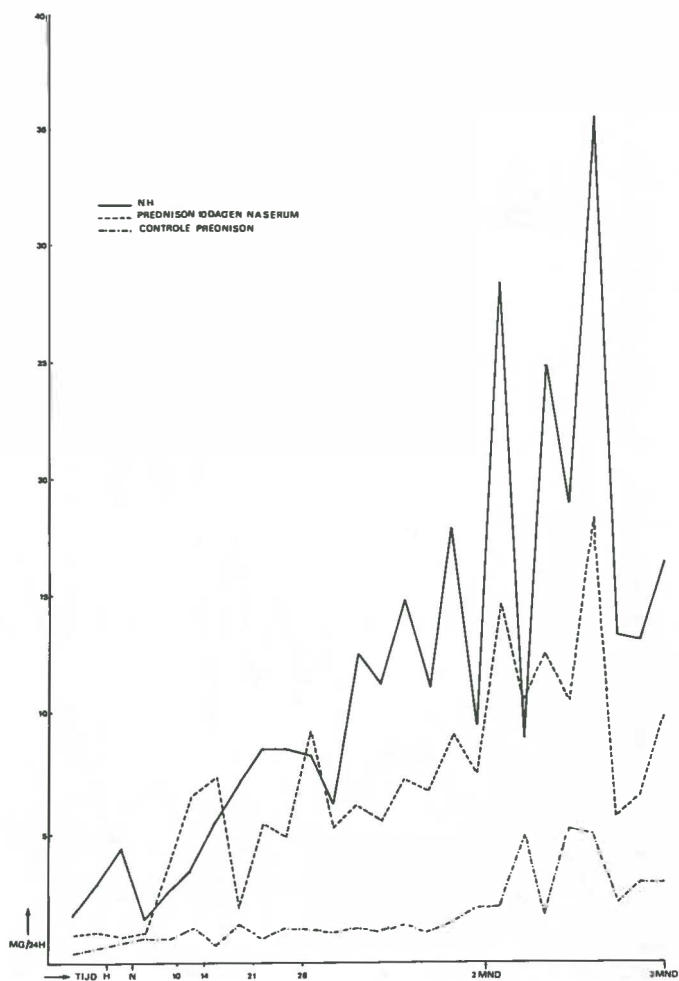
H = tijdstip waarop konijnen IgG werd toegediend. N = tijdstip van nefrectomie.

En zijn geen significante verschillen tussen de prednison-vooraf groep en de NH.



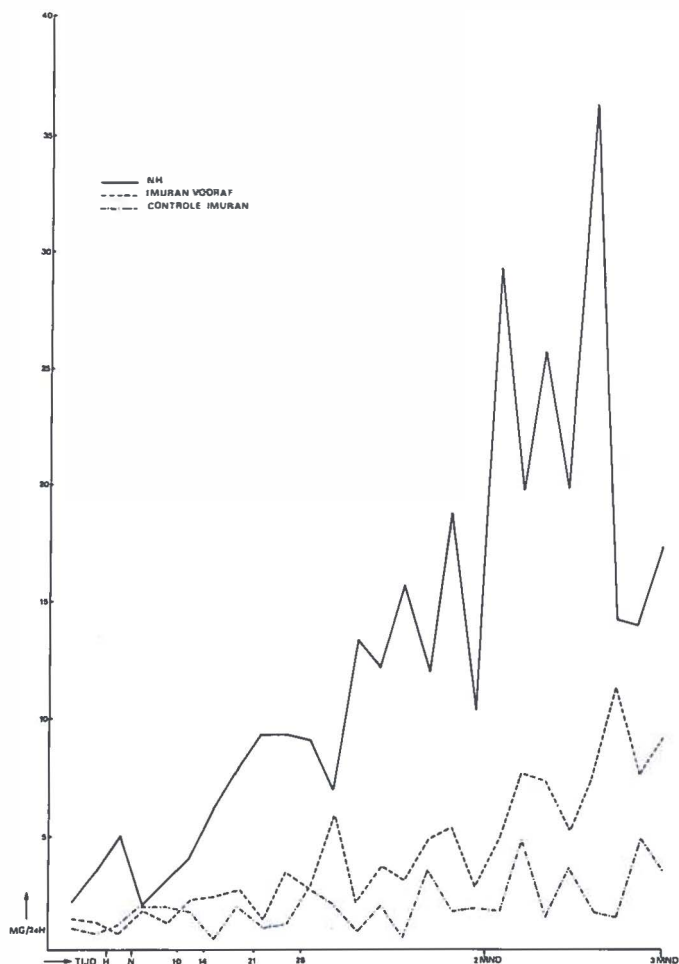
Grafiek III: Proteinurie beloop van de prednison-gelijk groep vergeleken met de NH en de controle ratten die dagelijks ook prednison kregen toegediend. De grafiek is uitgezet naar de middelste waarde van steeds die 5 ratten, die gedurende de gehele proefperiode van 90 dagen (= 3 mnd) werden vervolgd. H = tijdstip waarop konijnen IgG werd toegediend. N = tijdstip van nefrectomie.

Er zijn geen significante verschillen tussen de prednison-gelijk groep en de NH.



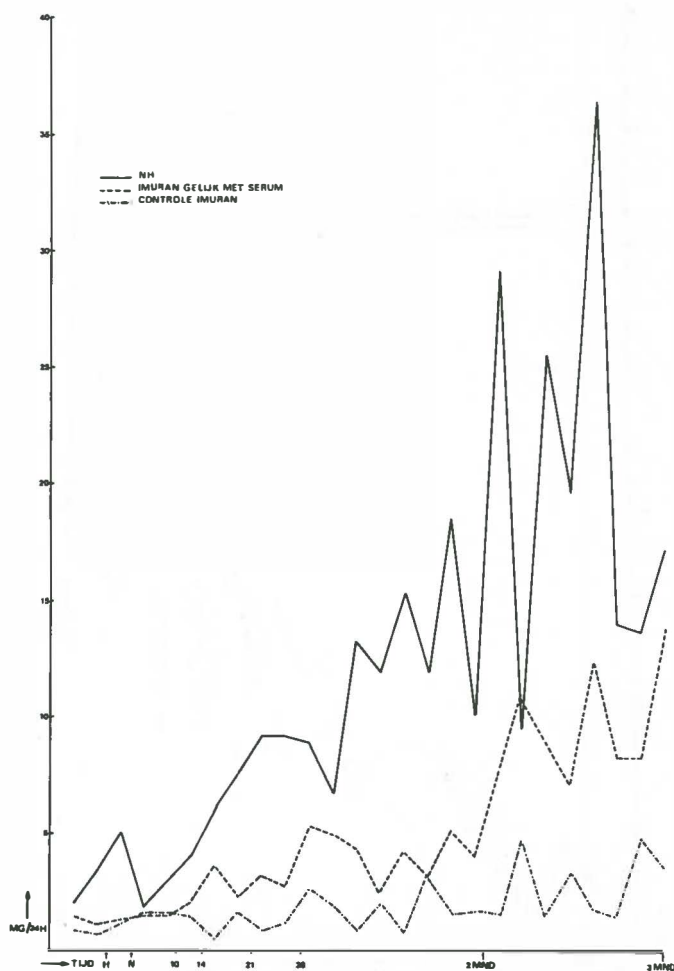
Grafiek IV: Proteinurie beloop van de prednison-na groep vergeleken met de NH en de controle ratten die dagelijks ook prednison kregen toegediend. De grafiek is uitgezet naar de middelste waarde van steeds die 5 ratten, die gedurende de gehele proefperiode van 90 dagen (= 3 mnd) werden vervolgd. H = tijdstip waarop konijnen IgG werd toegediend. N = tijdstip van nefrectomie.

Na 1½ maand en 3 maanden kan een significant verschil ($p < 0,05$, naar WILCOXON) worden aangetoond.



Grafiek V: Proteinurie beloop van de imuran-vooraf groep vergeleken met de NH en de controle ratten die dagelijks ook imuran kregen toegediend. De grafiek is uitgezet naar de middelste waarde van steeds die 5 ratten, die gedurende de gehele proefperiode van 90 dagen (= 3 mnd) werden vervolgd. H = tijdstip waarop konijnen IgG werd toegediend. N = tijdstip van nefrectomie.

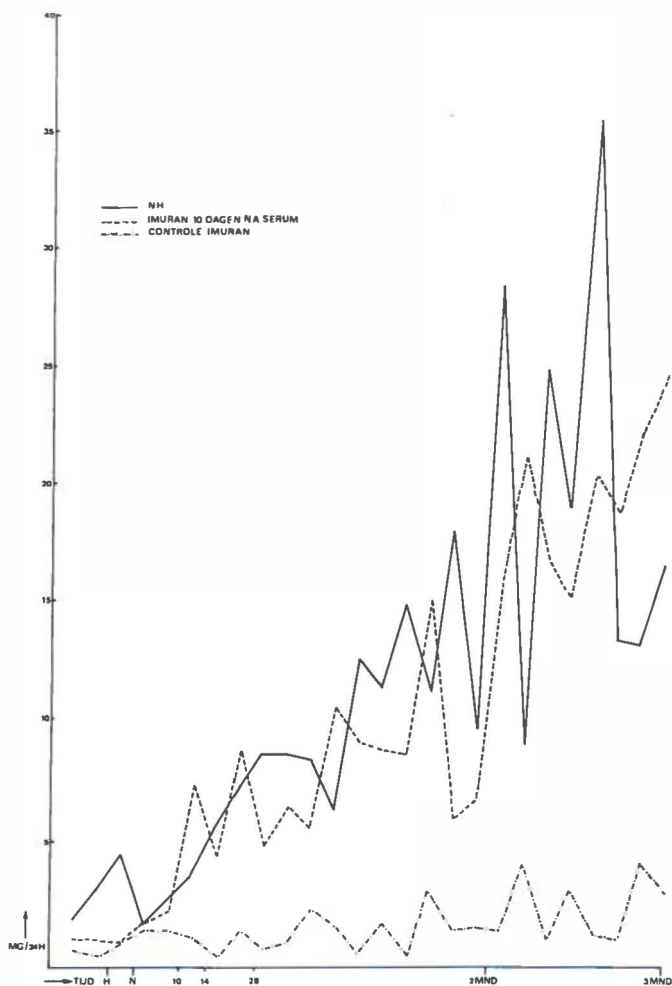
Er is steeds een significant verschil ($p < 0,05$) tussen de imuran-vooraf groep en de NH, terwijl er geen significant verschil tussen de imuran-vooraf en de controle groep kon worden aangetoond.



Grafiek VI: Proteinurie beloop van de imuran-gelijk groep vergeleken met de NH en de controle ratten die dagelijks ook imuran kregen toegediend. De grafiek is uitgezet naar de middelste waarde van steeds die 5 ratten, die gedurende de gehele proefperiode van 90 dagen (= 3 mnd) werden vervolgd.

H = tijdstip waarop konijnen IgG werd toegediend. N = tijdstip van nefrectomie.

Behoudens de bepalingen na 2 en 3 maanden, kon steeds een significant verschil tussen de imuran-gelijk groep en de NH worden aangetoond. Vanaf 2 maanden is er wel een significant verschil tussen de imuran-gelijk groep en de controle ratten. ($p < 0,05$)



Grafiek VII: Proteinurie beloop van de imuran-na groep vergeleken met de NH en de controle ratten die dagelijks ook imuran kregen toegediend. De grafiek is uitgezet naar de middelste waarde van steeds die 5 ratten, die gedurende de gehele proefperiode van 90 dagen (= 3 mnd) werden vervolgd. H = tijdstip waarop konijnen IgG werd toegediend. N = tijdstip van nefrectomie.

Er is geen significant verschil tussen de imuran-na groep en de NH, terwijl er wel steeds een significant ($p < 0,05$) verschil t.o.v. de controle groep kan worden aangetoond.

FOTO'S

De bij de lichtmicroscopische en fluorescentie foto's vermelde vergrotingen geven aan bij welke vergroting werd gefotografeerd. De vergroting van het negatief naar positief is daarbij niet ingecalculeerd.

Foto 1: Nefrotoxische glomerulonefritis:

Lineaire hechting van konijnen anti ratten GBM langs de GBM, 24 uur na i.p. toediening van het konijnen IgG aan de rat.

x 540, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 2: Immuuncomplex glomerulonefritis:

NH, 10 dg. Er is een diffuse, korrelige afzetting van konijnen IgG langs de GBM. We zien deels fijn, deels grof korrelige afzettingen.

x 220, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 3: Immuno-elektroforese van konijnen anti ratten C' IgG.

In de gaatjes: vers ratten serum; in de gleuf konijnen anti ratten C'.

Foto 4: Nefrotoxische glomerulonefritis bij de rat.

Een glomerulus van een rat, afgemaakt 24 uur na i.p. toediening van konijnen anti ratten GBM, toont een diffuse afzetting van het konijnen IgG in het filterende deel van de GBM. Het konijnen IgG is met behulp van de peroxydase techniek zichtbaar gemaakt. (HOEDEMAEKER, 59).

mes = mesangium; ep = epitheel; cap = capillaire lumen.

x 6500, immuno-elektronen microscopie met geit anti konijnen IgG.

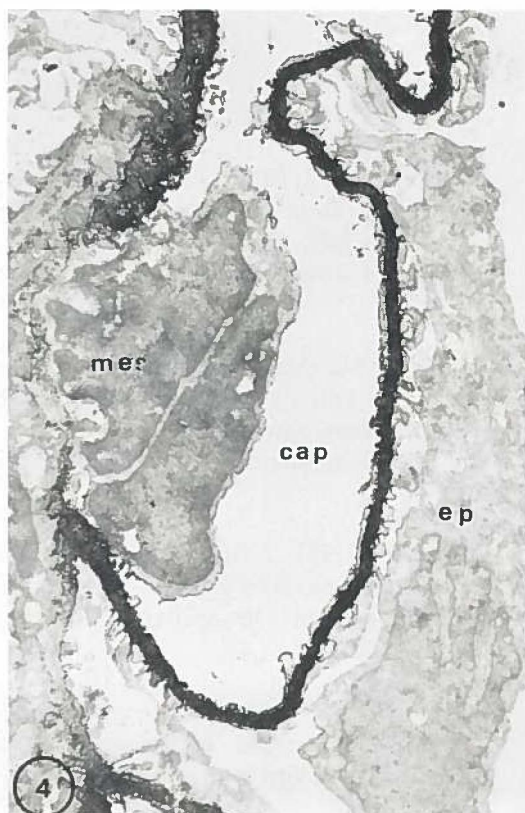
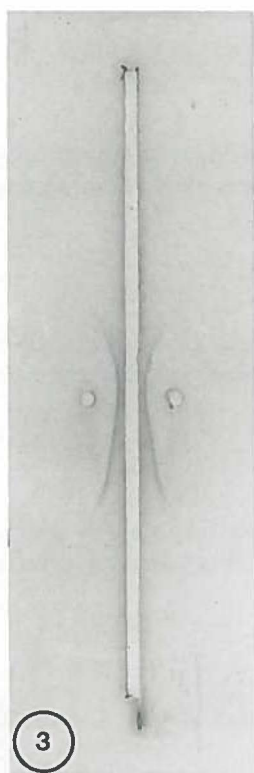
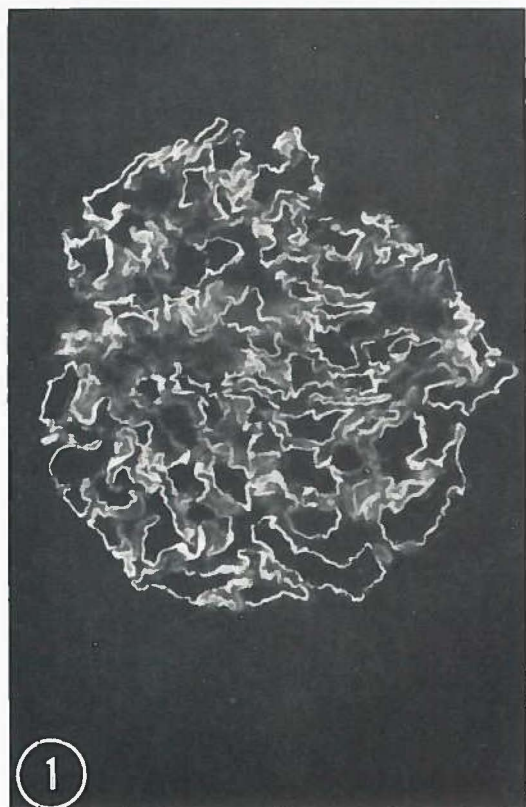


Foto 5: NH. 10 dg. Er is een diffuse granulaire afzetting van ratten IgG langs de GBM. Deze afzettingen blijven eerst nog iets achter t.o.v. de afzetting van konijnen IgG, vgl f 2.
x 540, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

Foto 6: Na elutie (zie Hfdst V) kon met behulp van aan fluoresceïne gekoppeld konijnen anti Fx_1A een afzetting van Fx_1A als onderdeel van het immuuncomplex worden aangetoond.
x 540, fluorescentie met konijnen anti Fx_1A .

Foto 7^a: NH. 2 dg. Er is na 2 dagen een lichte zwelling van de glomerulus waarneembaar. Het epitheel lijkt iets gezwollen te zijn (pijl). Er is geen infiltratie met leucocyten. De capillairen blijven goed open.
x 250, PAS.

Foto 7^b: Controle. Ter vergelijking van het beeld na 2 dagen. De verschillen t.o.v. de NH zijn miniem.
x 250, PAS.

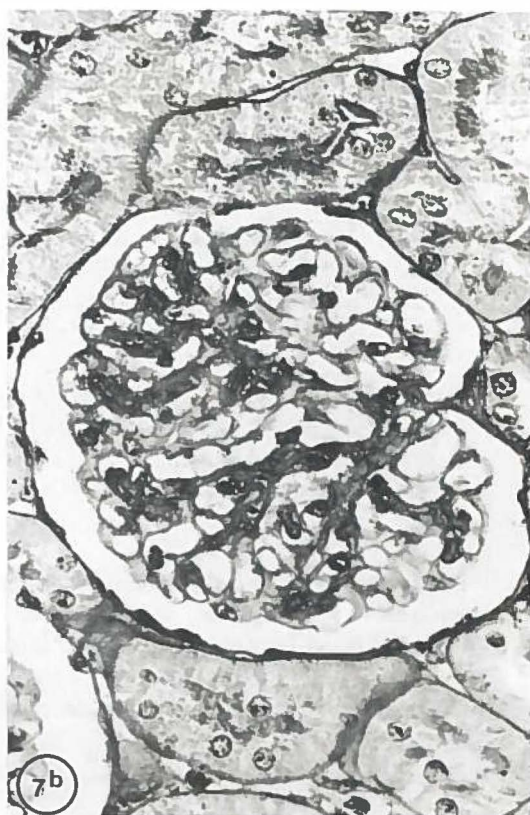
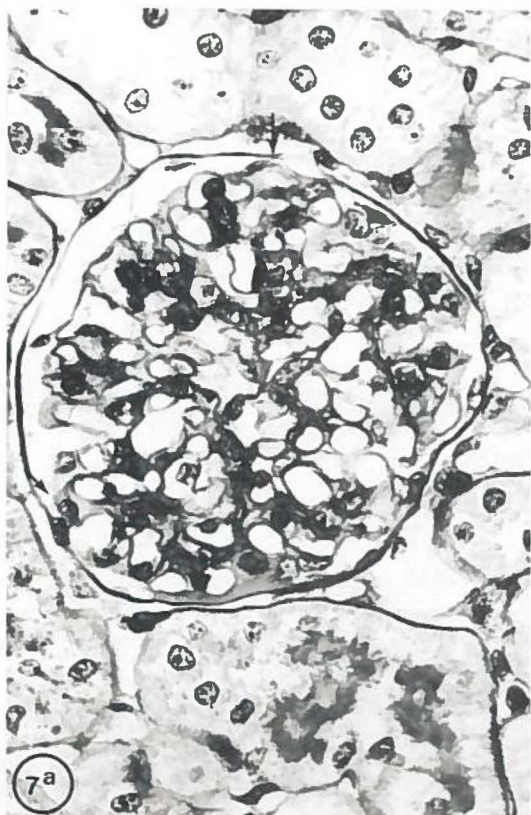
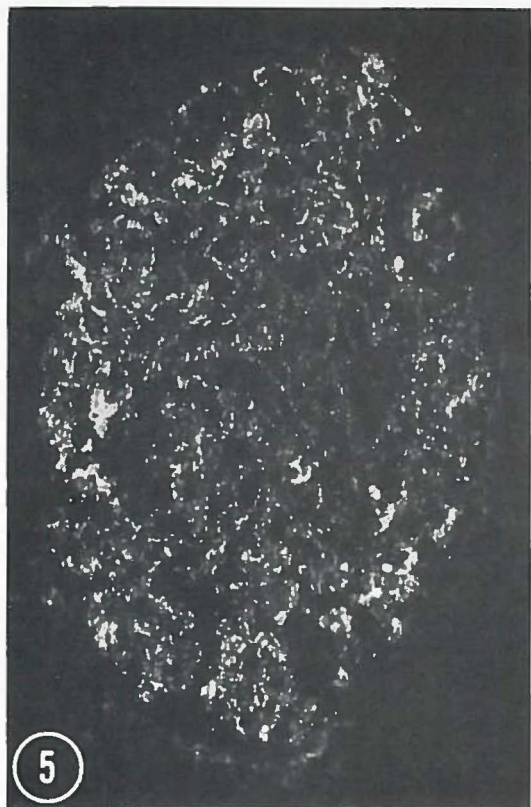


Foto 8: NH. 2 dg. Er is een, zij het zwakke, onmiskenbare diffuse fijn korrelige afzetting van konijnen IgG langs de GBM.
x 220, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 9: NH. 2 dg. Er is een geringe afzetting van C' langs de GBM waarneembaar. Er zijn fijne afzettingen te zien. De grove fluorescentie is aspecifiek, daar deze eveneens wordt gezien in de controle dieren.
x 540, fluorescentie met konijnen anti ratten C'.

Foto 10: NH. 2 dg. We zien een normale GBM, waarin de drie lagen (van endotheel naar epitheel resp.: lamina rara interna, lamina densa, lamina rara externa) goed herkenbaar zijn. De lamina densa is vlekkerig door afzetting van immuuncomplex aggregaten (*). Een enkel klein aggregaat ligt in de lamina rara externa, in de slit pore tussen de epitheel voetjes (pijl). Het epitheel (ep) lijkt iets gezwollen.
en = endotheel; cap = capillaire lumen.
x 22500, uranyl-lood.

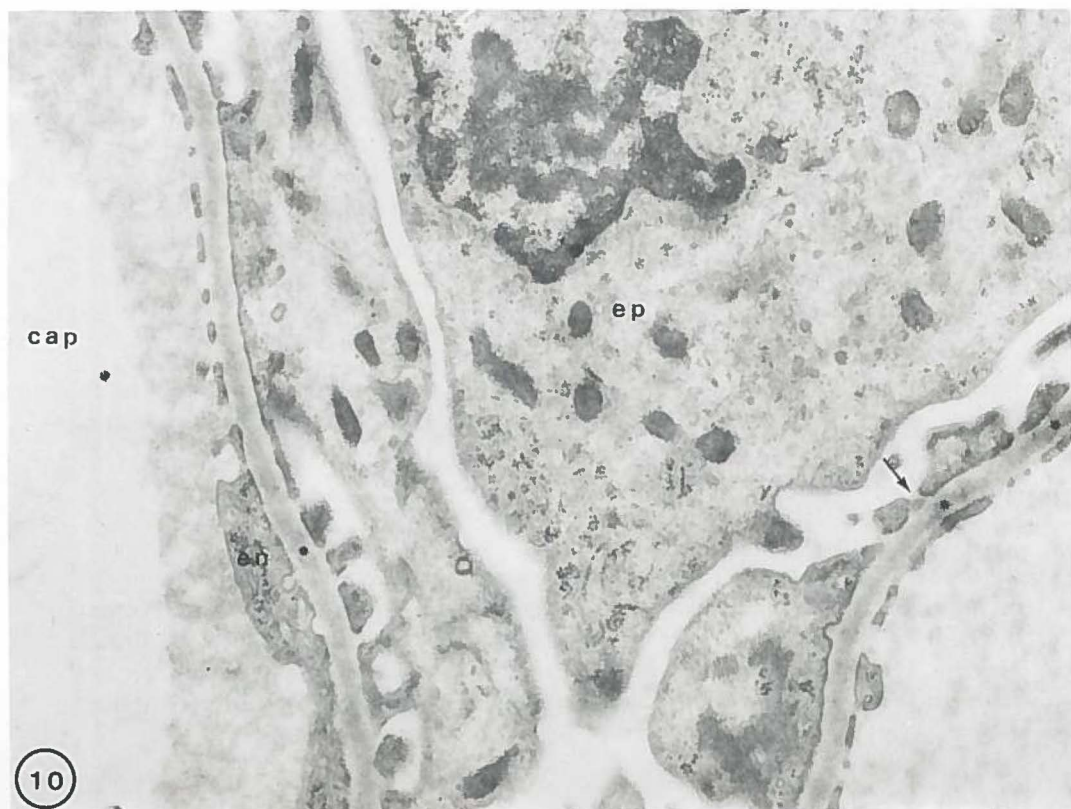


Foto 11: NH. 10 dg. Er is een duidelijke diffuse korrelige afzetting van C'. Een onmiskenbare toename t.o.v. de afzetting na 2 dagen (vgl f 9). De afzetting is ook grof korreliger geworden.
x 220, fluorescentie met konijnen anti ratten C'.

Foto 12: NH. 10 dg. We zien talrijke grotere immuuncomplex aggregaten (***) in de GBM. Deze zijn voornamelijk gelocaliseerd in de lamina rara externa. Boven deze grotere aggregaten zijn de epitheel (ep) voetjes gefuseerd (f). Enkele kleinere aggregaten zijn gelocaliseerd in de slit pores (pijl). Ook kunnen nog aggregaten in de lamina densa worden aangetroffen (*). De GBM is wisselend dik.

cap = capillaire lumen.
x 40000, uranyl-lood.

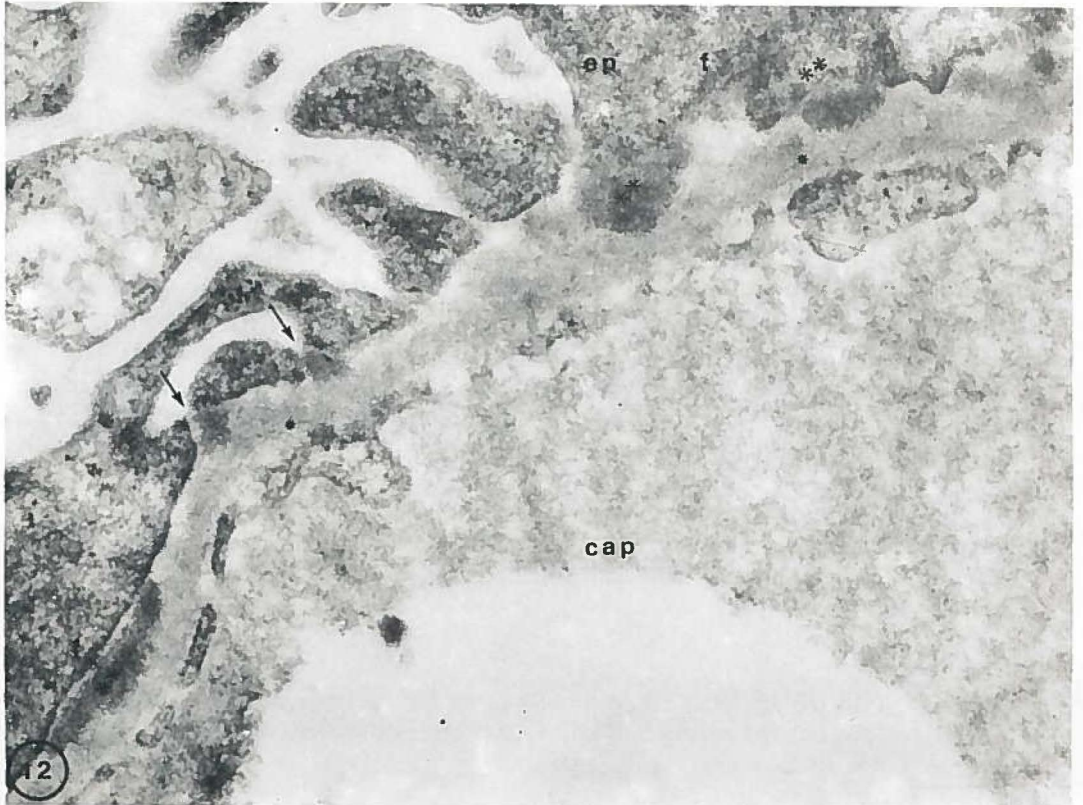


Foto 13: NH. 10 dg. Langs het mesangiale gebied is de GBM zeer kronkelig en niet meer goed te vervolgen. Door een toename van matrix (ma) is vaak de grens GBM-mesangium niet meer te bepalen. Zowel GBM als matrix lijken vlekkelig, mogelijk als gevolg van afzettingen van immuuncomplex aggregaten. ep = epitheel; mes = mesangium; pijl = immuuncomplex aggregaat (?).
x 22500, uranyl-lood.

Foto 14: NH. 30 dg. Er treedt een verbreding van het mesangium op, met een toename van PAS positief materiaal (*). Er is geen duidelijke cel toename.
x 250, PAS.

Foto 15: NH. 30 dg. Er is een verbreding van het mesangium met een toename van zilver positief materiaal. De GBM gaat iets kronkelen. Slechts een enkele perifere GBM-lis lijkt iets verdikt (pijl).
x 250, MZ.

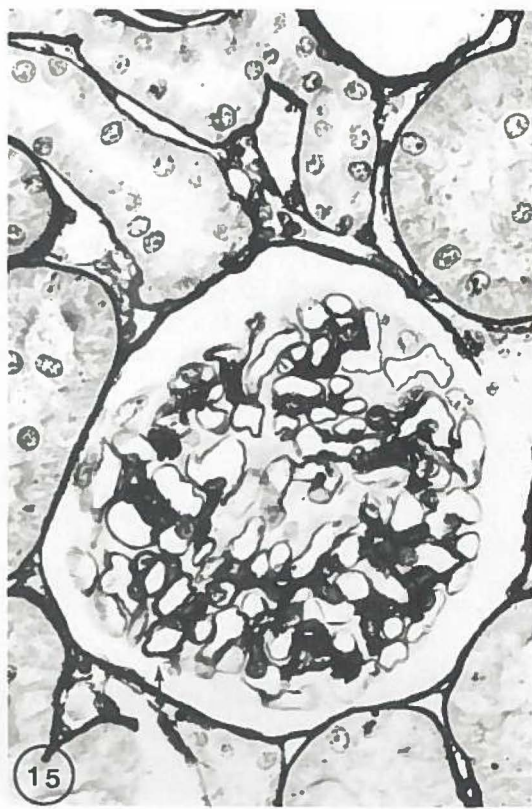
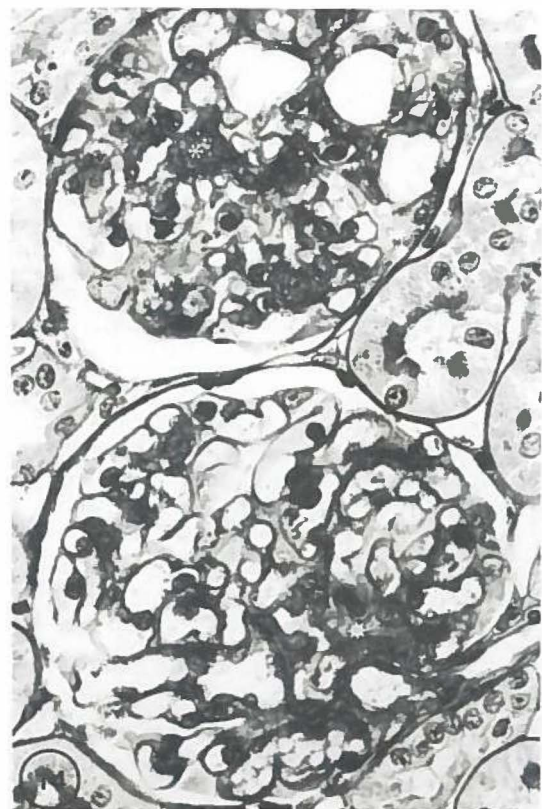
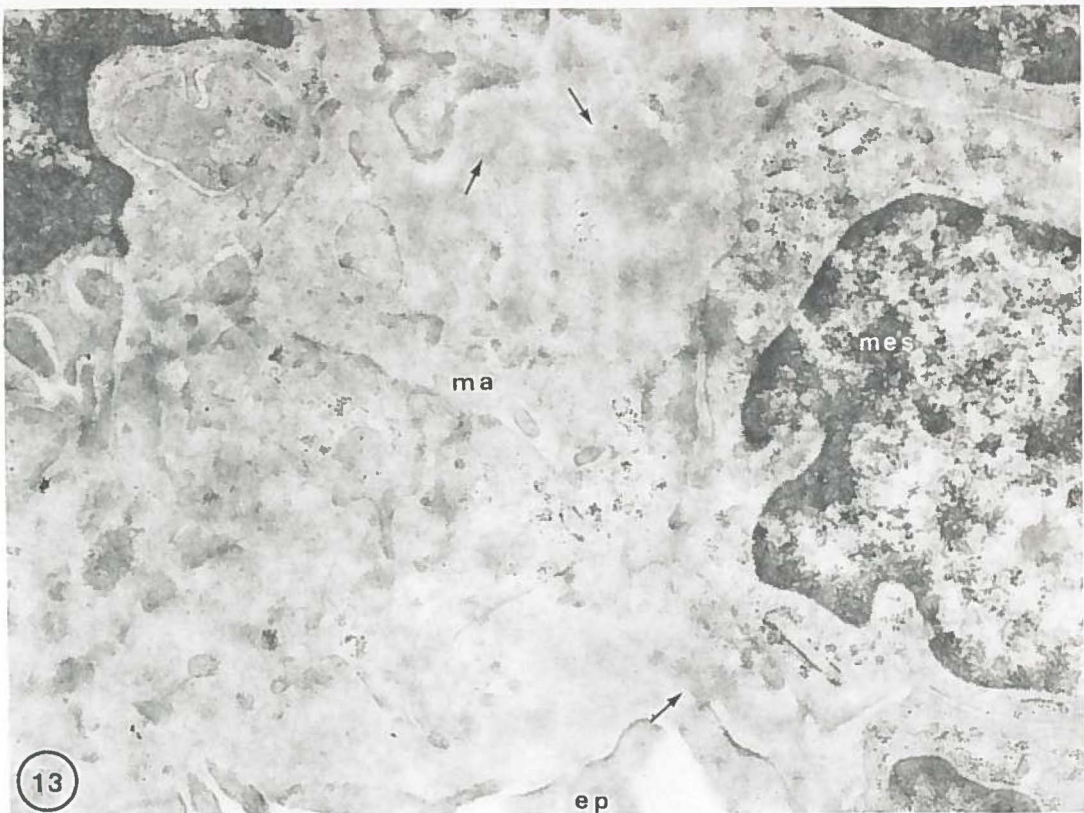


Foto 16: NH. 30 dg. De afzettingen van konijnen IgG zijn niet toegenomen (vgl f 2); een deels fijn, deels grof korrelige, afzetting diffuus langs de GBM. x 540, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 17: NH. 30 dg. De afzettingen van ratten IgG zijn mogelijk iets toegenomen t.o.v. 10 dagen (vgl f 5). Het beeld is nu geheel vergelijkbaar met dat van de afzetting van konijnen IgG; een deels fijn, deels grof korrelige fluorescentie diffuus langs de GBM. x 220, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

Foto 18: NH. 30 dg. Grote immuuncomplex aggregaten (*) liggen in de lamina rara externa tegen het epitheel (ep) aan. Enkele kleinere aggregaten liggen in de slit pore (korte pijl), terwijl een enkel aggregaat vanuit de slit pore tot onder het epitheel uit is gegroeid (lange pijl). De GBM verloopt kronkelig. x 57500, glycogeen kleuring.

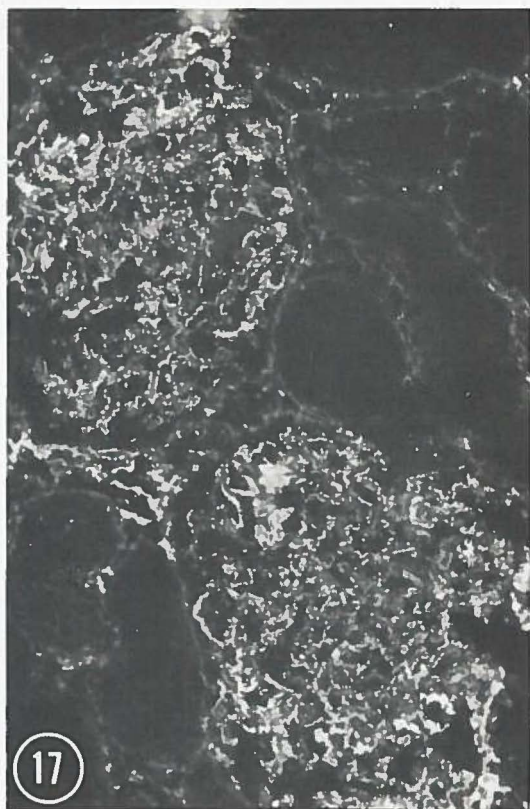
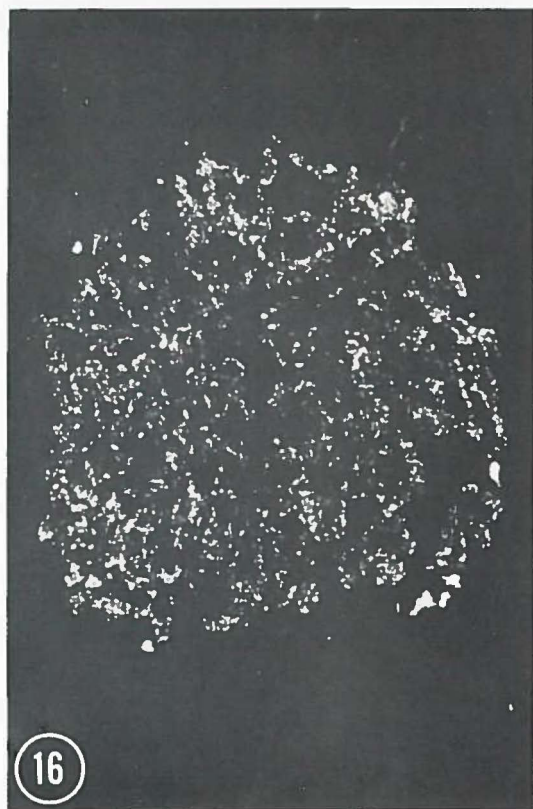


Foto 19: NH. 30 dg. Grote immuuncomplex aggregaten (*) liggen in de lamina rara externa. Het epitheel (ep) hierboven toont fusie van voetjes. Langs de aggregaten lijkt GBM substantie te zijn afgezet, waardoor met name naast de aggregaten de GBM is verdikt (pijl).
x 80000, glycogeen kleuring.

Foto 20: NH. 30 dg. Zeer lokaal kan een enkel immuuncomplex aggregaat (*) aangetroffen worden dat geheel door GBM massa is omgeven. Zowel „boven” als „onder” het aggregaat lijkt een lamina densa (ld) aanwezig te zijn. Tevens op deze foto een aggregaat nog direct tegen het epitheel (ep) aan (pijl).
x 99750, uranyl-lood.

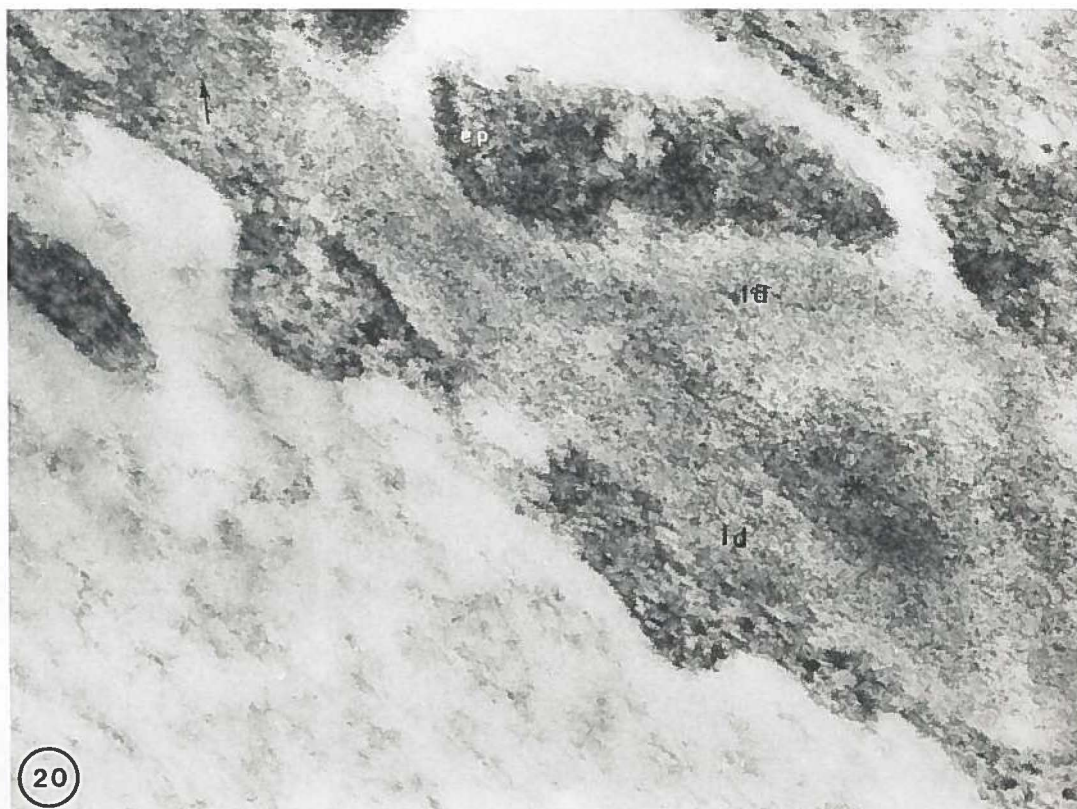


Foto 21^a: NH. 90 dg. Na 90 dagen lijken de afzettingen van konijnen IgG geheel gelijk aan die van na 30 dagen. Nog steeds is er een vrij dichte diffuse afzetting langs de GBM, deels fijn, deels grof korrelig.
x 220, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 21^b: Als 21^a.
x 540.

Foto 22^a: NH. 90 dg. Na 90 dagen is het fluorescentie beeld van de afzetting van ratten IgG geheel gelijk aan dat van de afzetting van konijnen IgG.
x 220, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

Foto 22^b: Als 22^a. Dezelfde glomerulus werd nu gefotografeerd bij een vergroting 10 x 54 (oculair x objectief) i.p.v. 10 x 22, dit om een betere vergelijking mogelijk te maken met de foto's 71 en 72.
x 540.

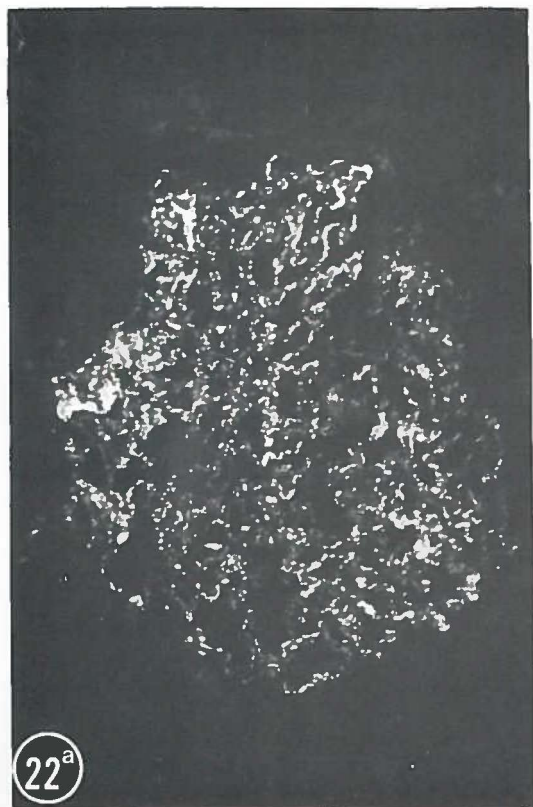
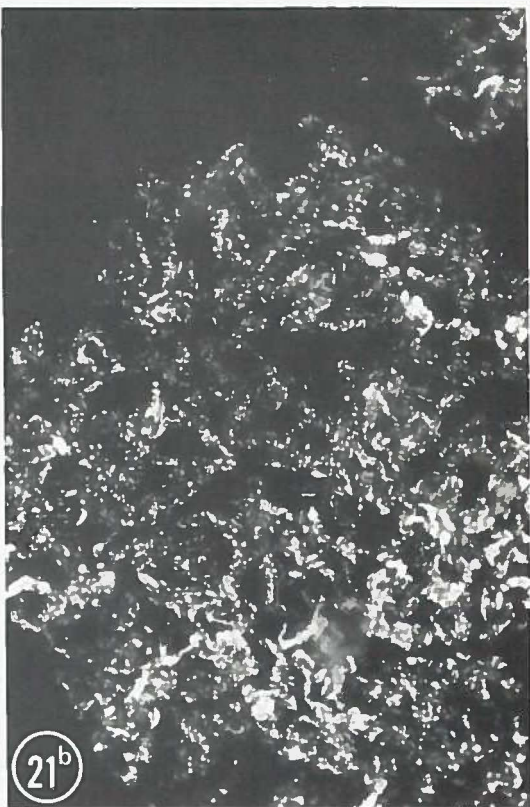


Foto 23: NH. 90 dg. De afzetting van C' blijft vergelijkbaar met die van 10 dagen (vgl f 11). Een diffuse, merendeels fijn korrelige afzetting langs de GBM. x 220, fluorescentie met konijnen ratten C'.

Foto 24: NH. 90 dg. Het mesangium is verbreed en bevat meer PAS/zilver positief materiaal (*). De GBM is lokaal iets gekronkeld en verdikt (korte pijl). Soms zien we een zgn „moth eaten” aspect (lange pijl). Er is geen cel toename, noch infiltratie met leucocyten.
x 250, MZ.

Foto 25: NH. 90 dg. De GBM is onregelmatig verbreed en gekronkeld, vooral langs het mesangiale gebied (mes). De GBM lijkt hier soms verdubbeld te zijn (pijl). Celdelen lijken ingesloten te zijn door GBM en/of matrix (*). In deze gebieden is een fusie van epitheel (ep) voetjes te zien.
x 14500, uranyl-lood.

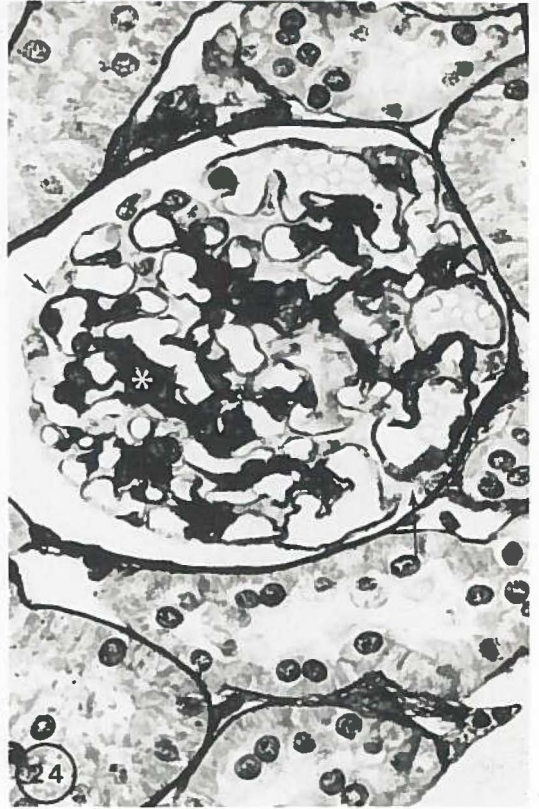
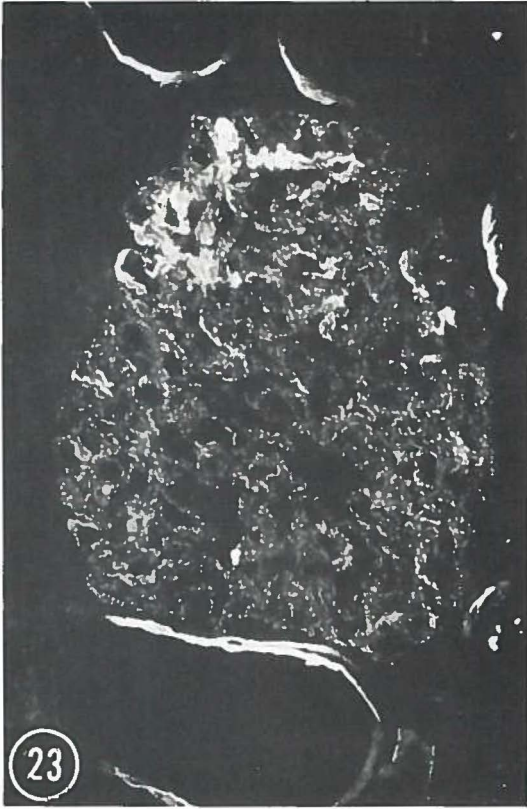




Foto 26: NH. 90 dg. Met behulp van de immuno-elektronen microscopie zien we afzettingen van immuuncomplex aggregaten subepitheliaal. Langs de grote aggregaten is afzetting van GBM substantie waarneembaar, waardoor het beeld van spikes (pijl) ontstaat. Boven de afzetting is het epitheel (ep) gefuseerd. De GBM is onregelmatig verdikt.

cap = capillaire lumen.

x 128000, immuno-elektronen microscopie.

Foto 27: NH. 90 dg. Langs de aggregaten zien we afzetting van GBM, nu behalve langs het aggregaat ook tussen het aggregaat en het epitheel (ep), zie pijl. Het aggregaat wordt daardoor meer omgeven door GBM substantie. De GBM is onregelmatig verdikt.

cap = capillaire lumen.

x 128000, immuno-elektronen microscopie.

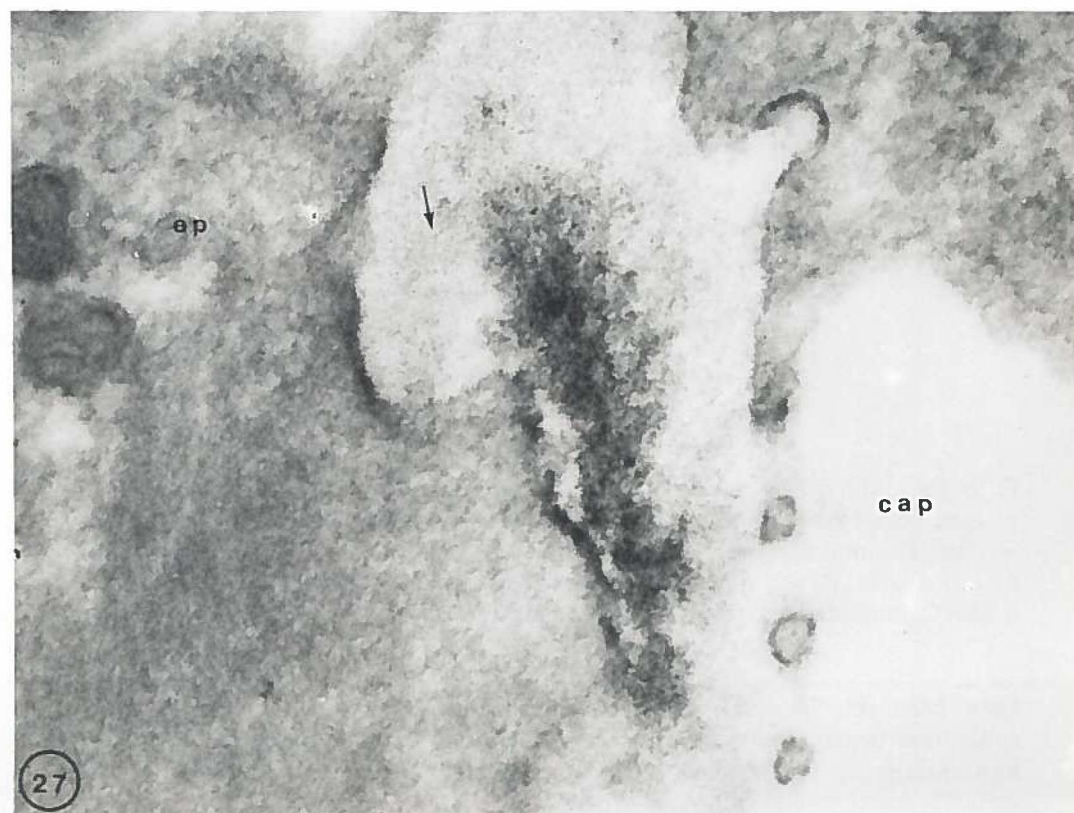
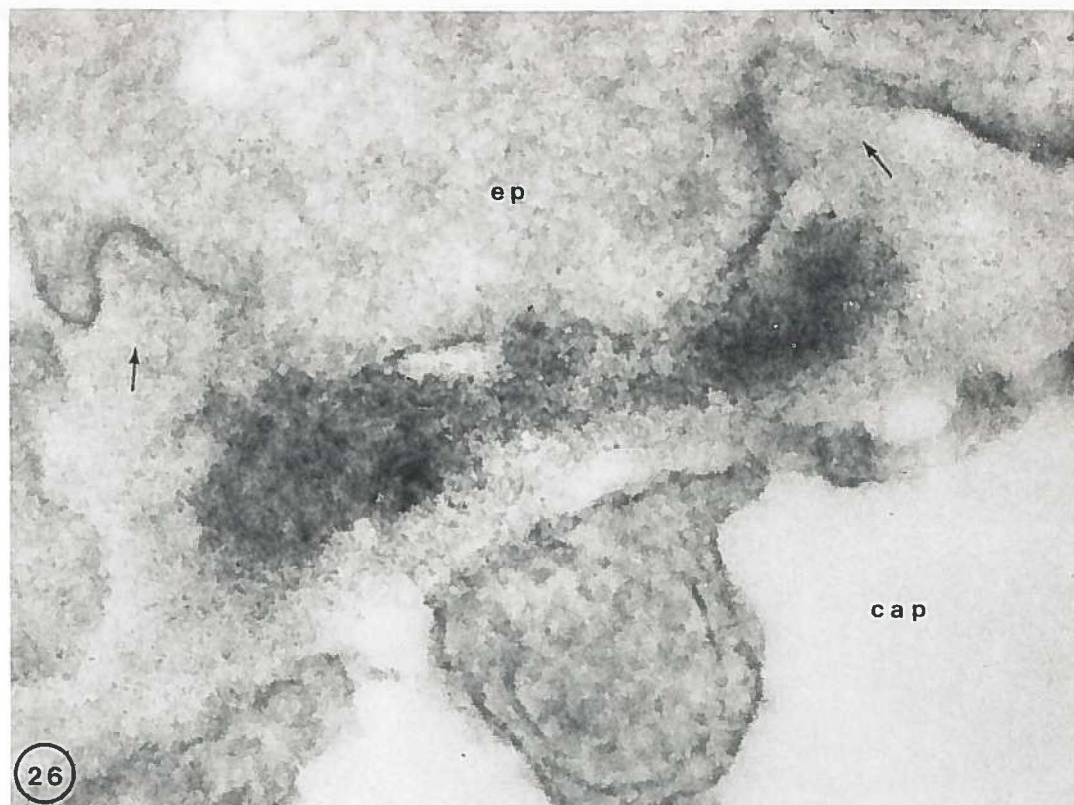


Foto 28: NH. 90 dg. Naast immuuncomplex aggregaten geheel sub-epitheliaal gelegen (pijl), zien we aggregaten omgeven door GBM substantie (*), waarvan een gedeelte nog tegen het epitheel lijkt aan te liggen (**). De GBM is onregelmatig verdikt. Boven de aggregaten zijn de epitheel (ep) voetjes gefuseerd.
x 80000, immuno-elektronen microscopie.

Foto 29: NH. 90 dg. Naast immuuncomplex aggregaten die nog direct sub-epitheliaal liggen, zien we ook aggregaten die geheel zijn omgeven door GBM substantie (pijl). Het epitheel (ep) hierboven toont fusie van de voetjes.
x 80000, immuno-elektronen microscopie.

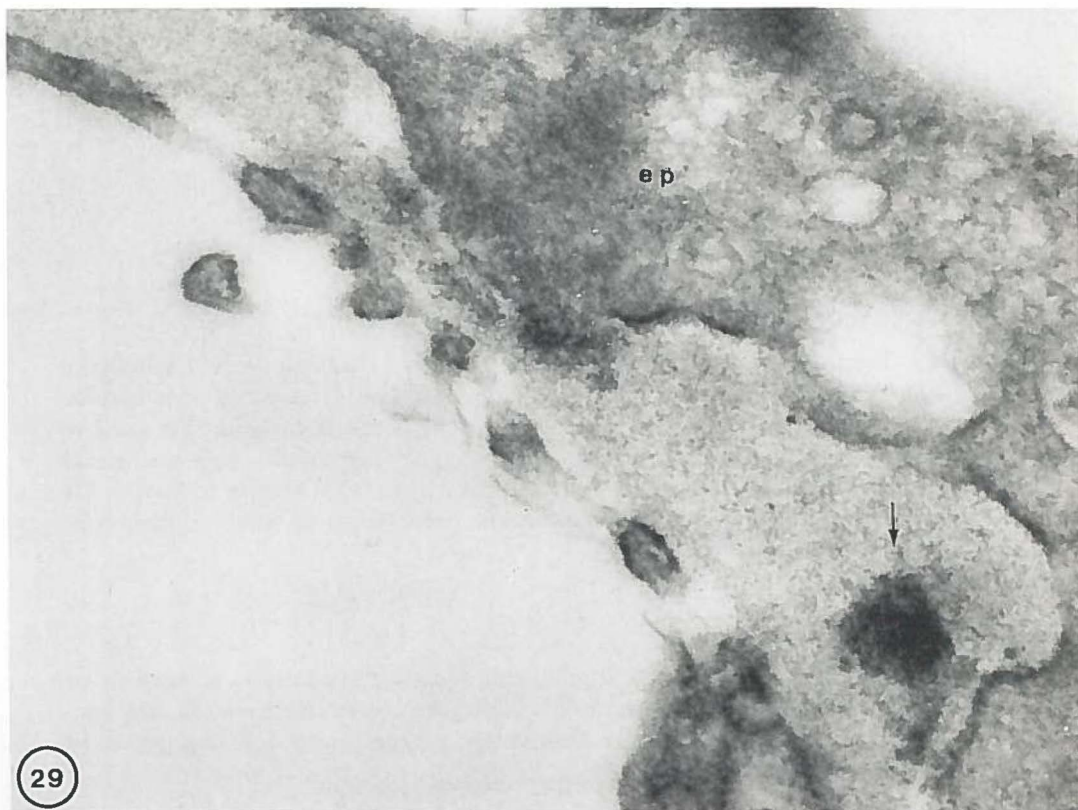
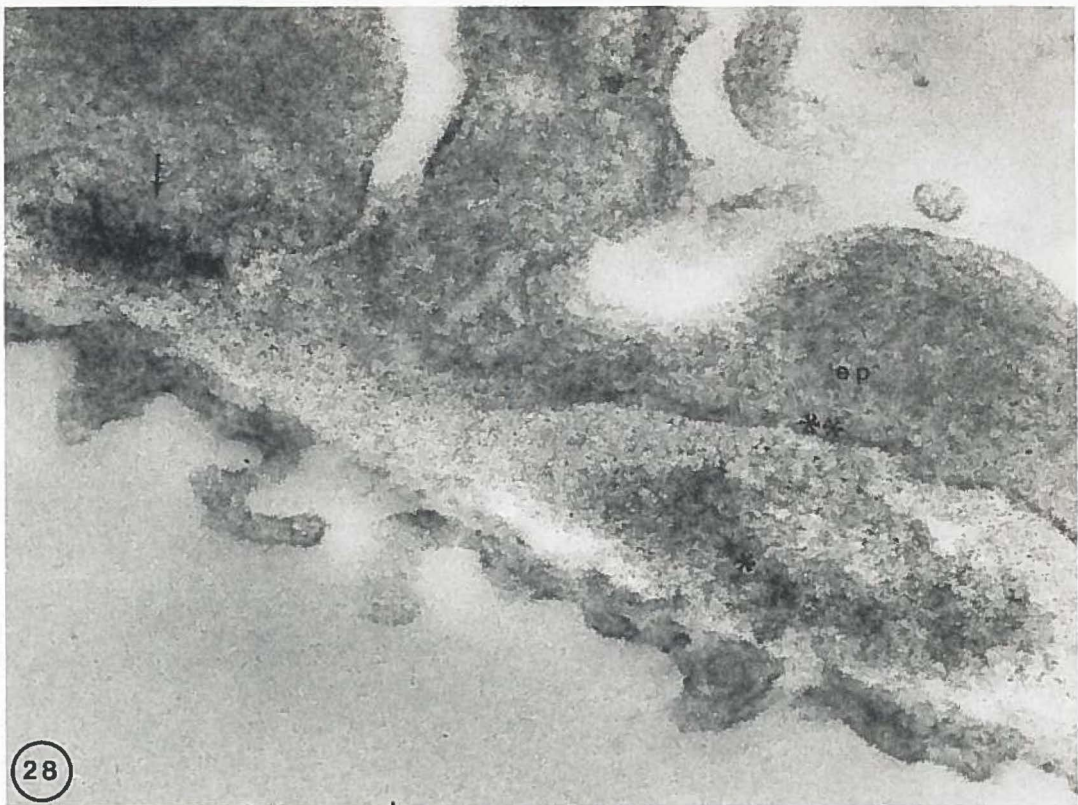


Foto 30: Prednison-vooraf. 30 dg. In deze groep is evenals in de NH een sterke kronkeling van de GBM langs het mesangiale gebied waarneembaar. Mede door de toename van matrix (ma) is de grens tussen GBM en mesangium niet goed te zien. Grotere immuuncomplex aggregaten liggen merendeels sub-epitheliaal (pijl), terwijl boven deze aggregaten het epitheel fusie van voetjes toont (f). De vlekkerige tekening van de matrix zou kunnen wijzen op de aanwezigheid van immuuncomplex aggregaten (*).
x 18500, uranyl-lood.

Foto 31: Prednison-gelijk. 2 dg. Immuuncomplex aggregaten zijn gelegen in de slit pores van de lamina rara externa (*). Deze aggregaten hebben deels nog verbinding met de lamina densa (pijl). Enkele aggregaten liggen ook nog geheel in de lamina densa (**).
x 92500, uranyl-lood.

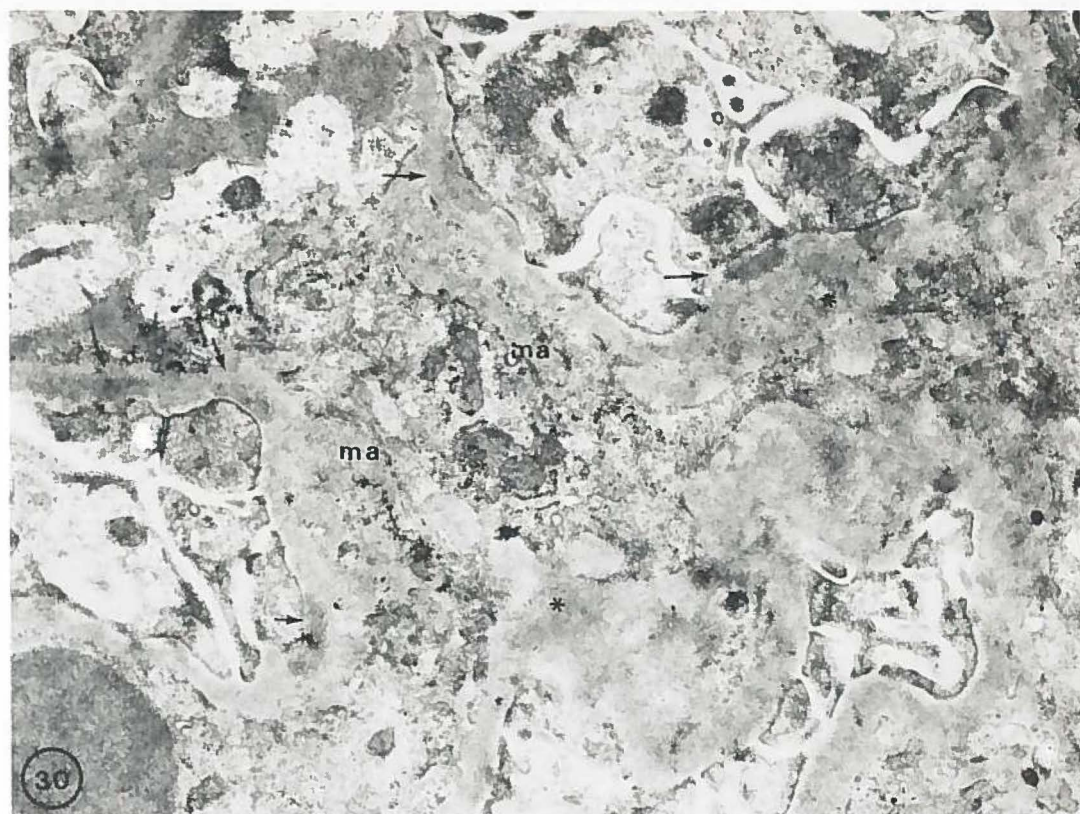


Foto 32: Prednison-gelijk. 14 dg. Naast grotere immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa, die deels nog verbinding hebben met de lamina densa (pijl), zien we ook nog geheel in de lamina densa gelegen aggregaten (*). Er is fusie van epitheel (ep) voetjes.

x 80000, uranyl-lood.

Foto 33: Prednison-gelijk. 30 dg. Hoewel het merendeel van de glomerulus een beeld toont, zoals dat ook in de NH wordt gezien, zijn er lokaal ook delen van de GBM waar nog kleinere immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa worden aangetroffen (*), terwijl de vlekkerige lamina densa wijst op daarin nog aanwezige aggregaten (pijl). Er is tevens fusie van de epitheel (ep) voetjes (f).

x 51000, uranyl-lood.

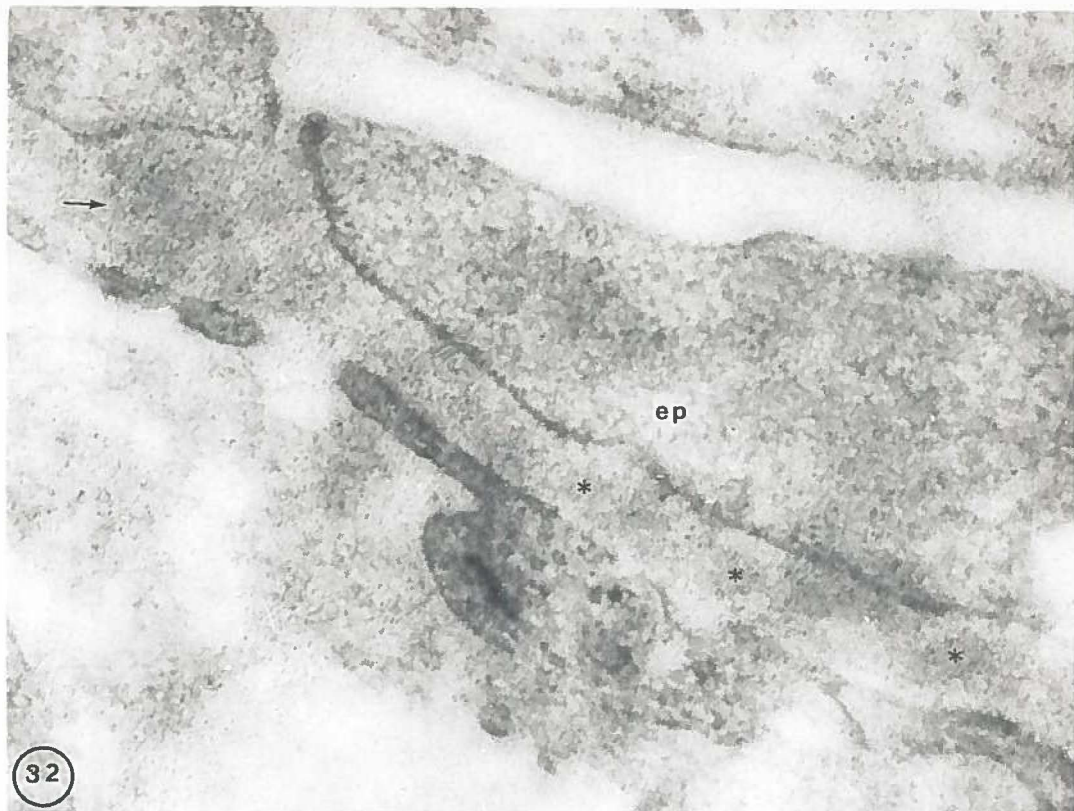


Foto 34: Prednison-gelijk. 90 dg. De GBM is onregelmatig verdikt. Grote immuuncomplex aggregaten, die deels nog geheel sub-epitheliaal liggen (korte pijl), zijn afgezet in de GBM. Ze zijn soms geheel omgeven door GBM substantie, waardoor de idee van opsplitsing van de GBM ontstaat (lange pijl). De epitheel (ep) voetjes zijn gefuseerd.
x 51000, glycogeen kleuring.

Foto 35: Prednison-gelijk. 90 dg. Evenals in de NH treedt hier ook duidelijke spike vorming op, doordat langs de immuuncomplex aggregaten GBM substantie wordt afgezet (korte pijl). Enkele spikes lijken zich „om te buigen” tussen epitheel (ep) en aggregaat (lange pijl).
x 51000, immuno-elektronen microscopie.



Foto 36: Prednison-na. 90 dg. Grote immuuncomplex aggregaten zijn bijna geheel omgeven door GBM substantie, dat mogelijk tussen aggregaat en epitheel (ep) is afgezet. In het midden houdt het aggregaat nog contact met het epitheel (pijl).

x 199000, immuno-elektronen microscopie.

Foto 37: Imuran-vooraf. 2 dg. Langs het mesangiale gebied (mes), zien we kleine immuuncomplex aggregaten afgezet in de lamina rara interna (korte pijl), terwijl ook enkele kleine aggregaten in de lamina rara externa zijn gelocaliseerd (lange pijl).

ep = epitheel.

x 18400, uranyl-lood.

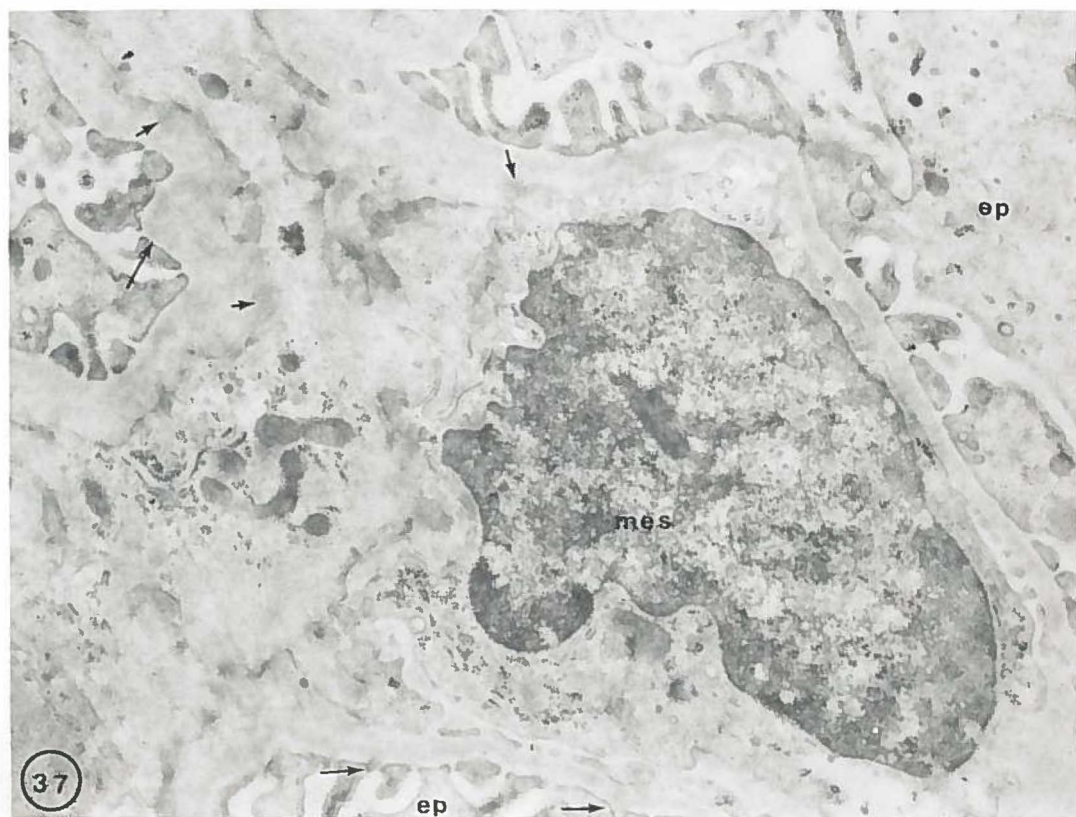
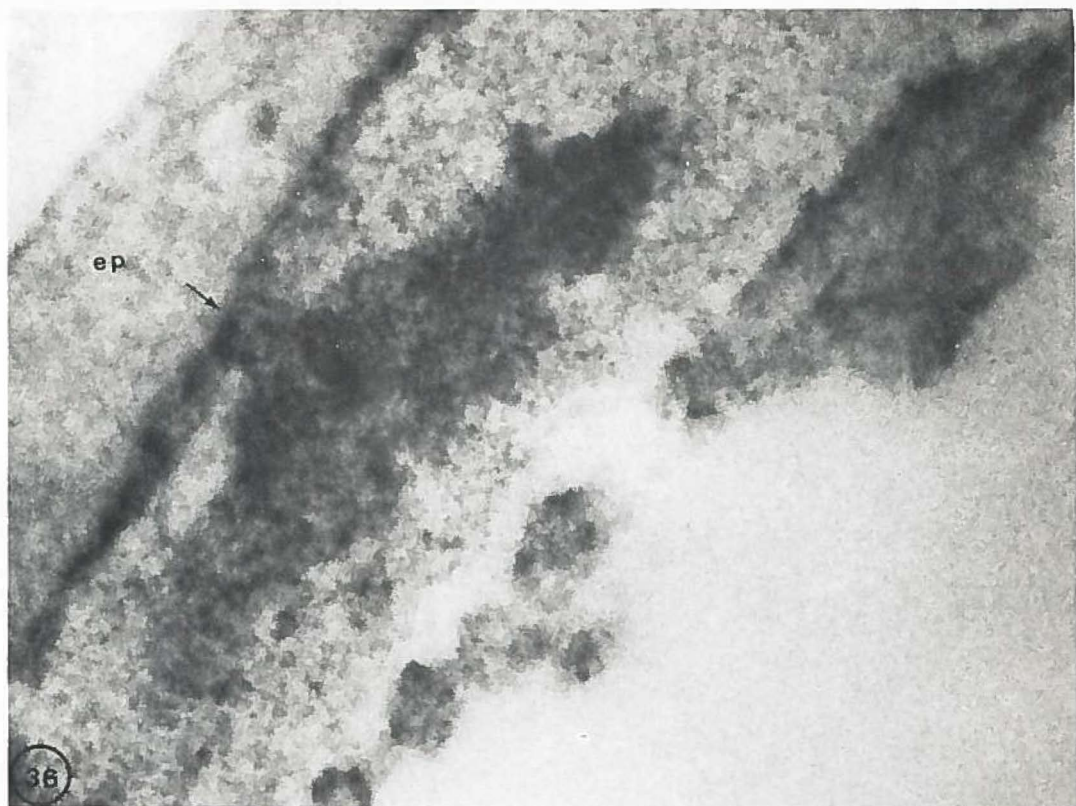


Foto 38: Imuran-vooraf. 10 dg. Na 10 dagen zien we een diffuse, merendeels fijn korrelige afzetting van konijnen IgG langs de GBM. Vergeleken met de NH na 10 dagen (f 2), lijken er iets minder afzettingen te zijn.
x 220, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 39: Imuran-vooraf. 10 dg. De GBM lijkt normaal. Wel zien we merendeels kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa (*). Vaak zijn deze in de slit pore gelocaliseerd. Enkele aggregaten liggen in de lamina densa (pijl).
ep = epitheel.
x 99750, uranyl-lood.

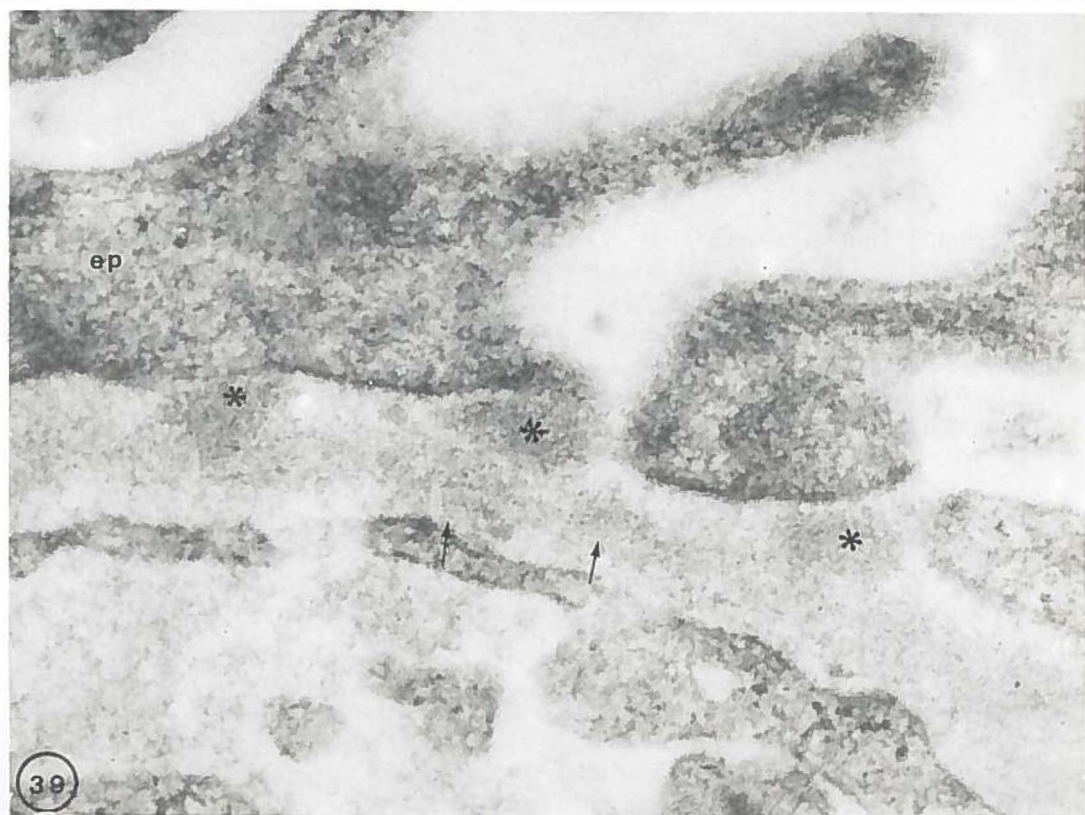
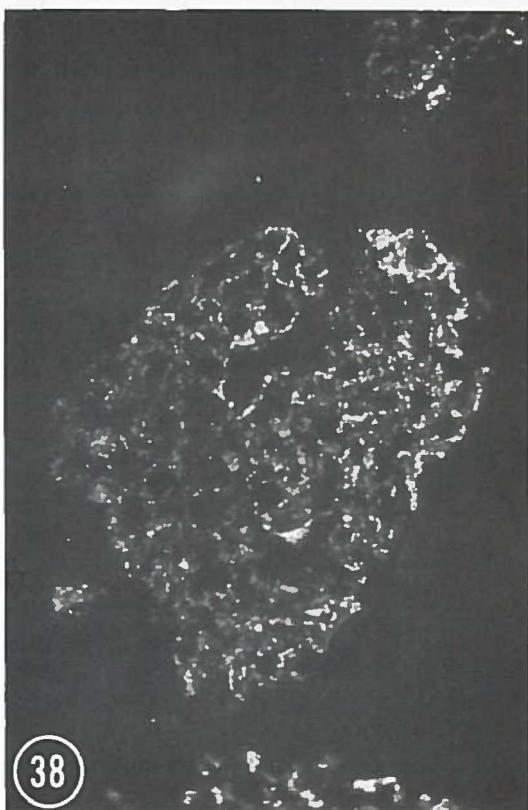


Foto 40: Imuran-vooraf. 30 dg. De GBM is minder afwijkend dan in de NH (vgl f 19, 20). De in de GBM afgezette immuuncomplex aggregaten zijn duidelijk minder groot (vgl f 18, 19, 20) dan in de NH. Tevens zijn de aggregaten zowel in de lamina rara externa gelocaliseerd (*), als op de grens lamina densa/lamina rara externa (korte pijl), alsook in de lamina rara interna (lange pijl).
ep = epitheel; en = endotheel; cap = capillaire lumen.
x 80000, uranyl-lood.

Foto 41: Imuran-vooraf. 90 dg. Er is een diffuse afzetting van konijnen IgG langs de GBM, deels fijn, deels grof korrelig. Er is geen verschil met de NH (vgl f 21).
x 540, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 42: Imuran-vooraf. 90 dg. Er is een diffuse afzetting van ratten IgG, die niet onderdoet voor die gezien in de NH na 90 dagen (vgl f 22) en tevens vergelijkbaar is met de afzetting van konijnen IgG (f 41).
x 540, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

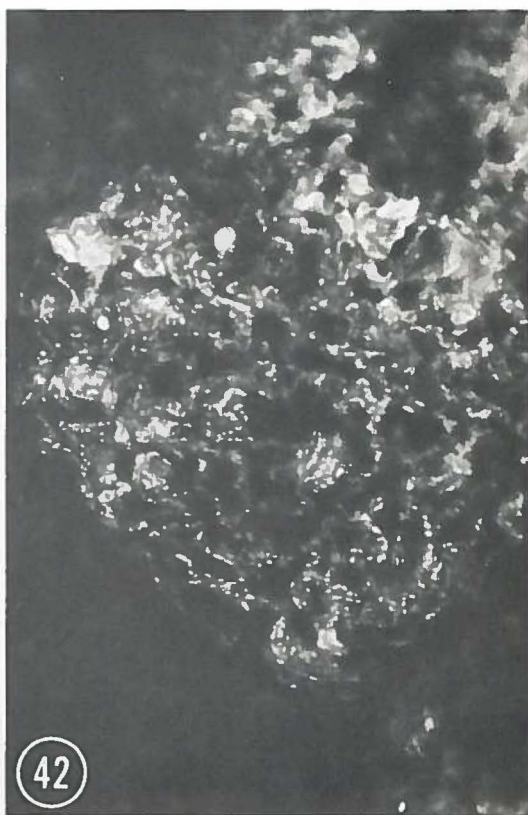
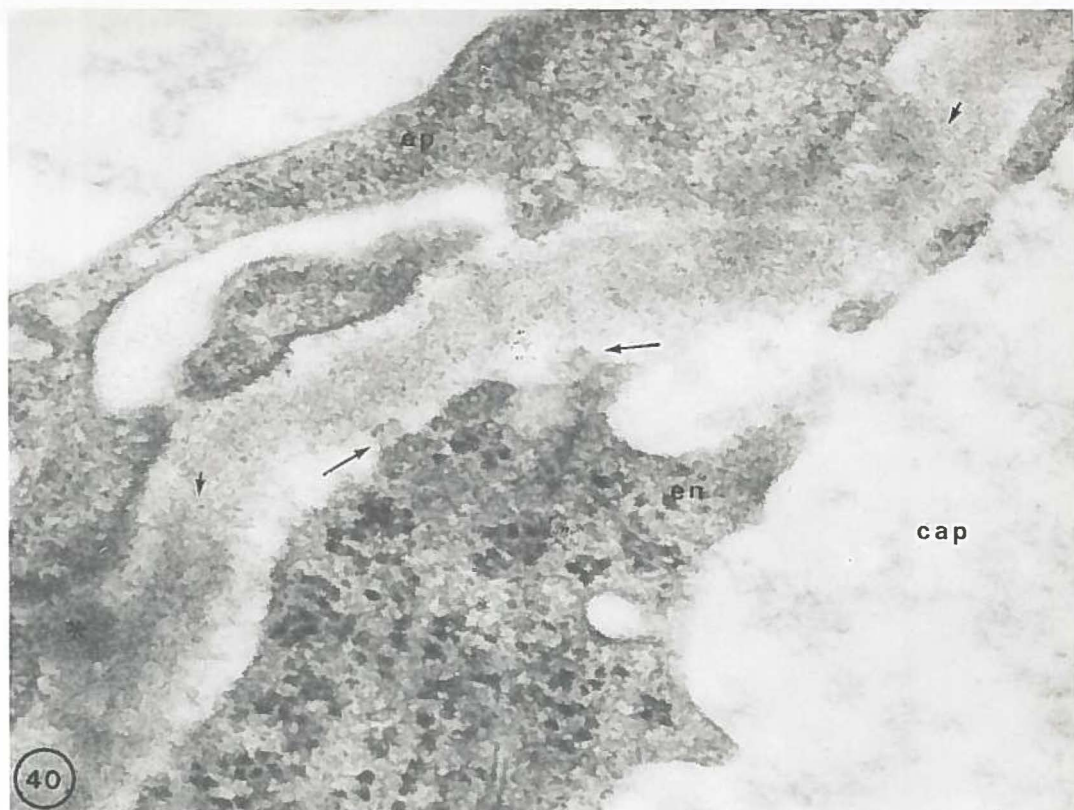


Foto 43: Imuran-vooraf. 90 dg. De GBM is normaal en niet verdikt. Wel zien we meerdere kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina densa (pijl). De epitheel (ep) voetjes zijn niet gefuseerd.
en = endotheel; cap = capillaire lumen.
x 22500, glycogeen kleuring.

Foto 44: Imuran-vooraf. 90 dg. Naast normale delen van de GBM zien we delen die onregelmatig zijn verdikt, doch duidelijk minder ernstig dan in de NH (vgl f 26 t/m 29). De in de lamina rara externa afgezette immuuncomplex aggregaten zijn kleiner dan in de NH. Langs de grootste afzettingen is een aanduiding van spike vorming te zien (pijl). Er is slechts sporadisch wat fusie van epitheel (ep) voetjes.
en = endotheel; cap = capillaire lumen.
x 22500, uranyl-lood.

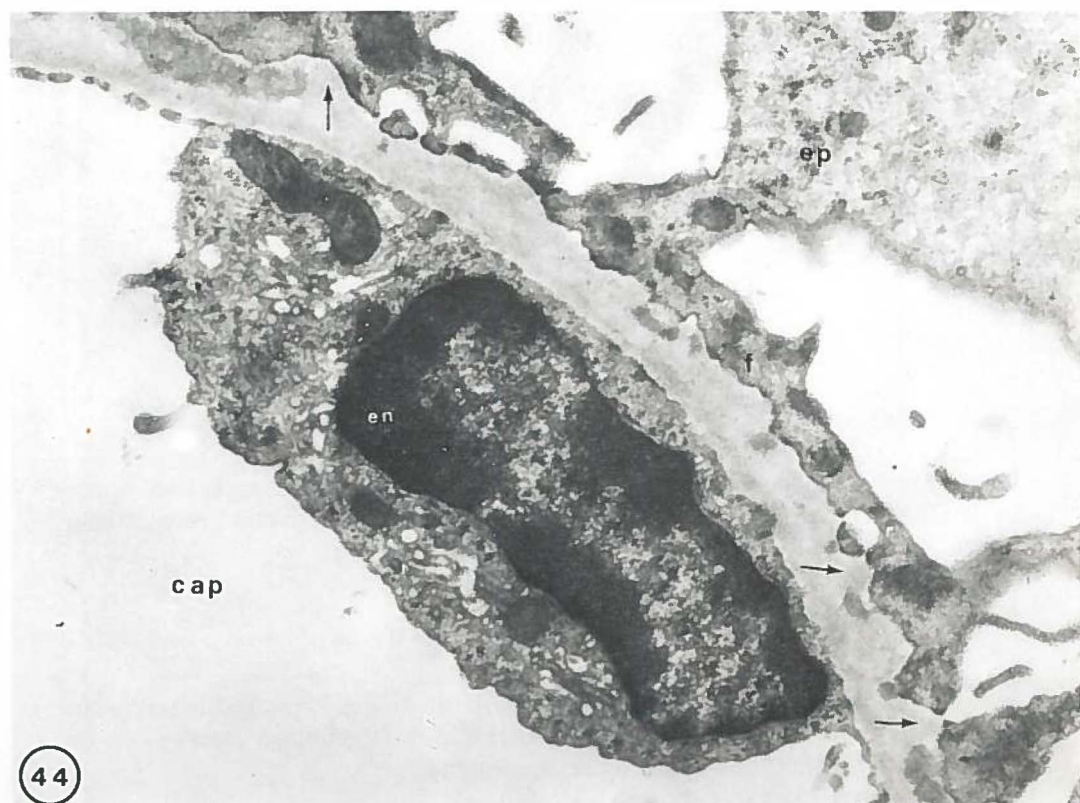
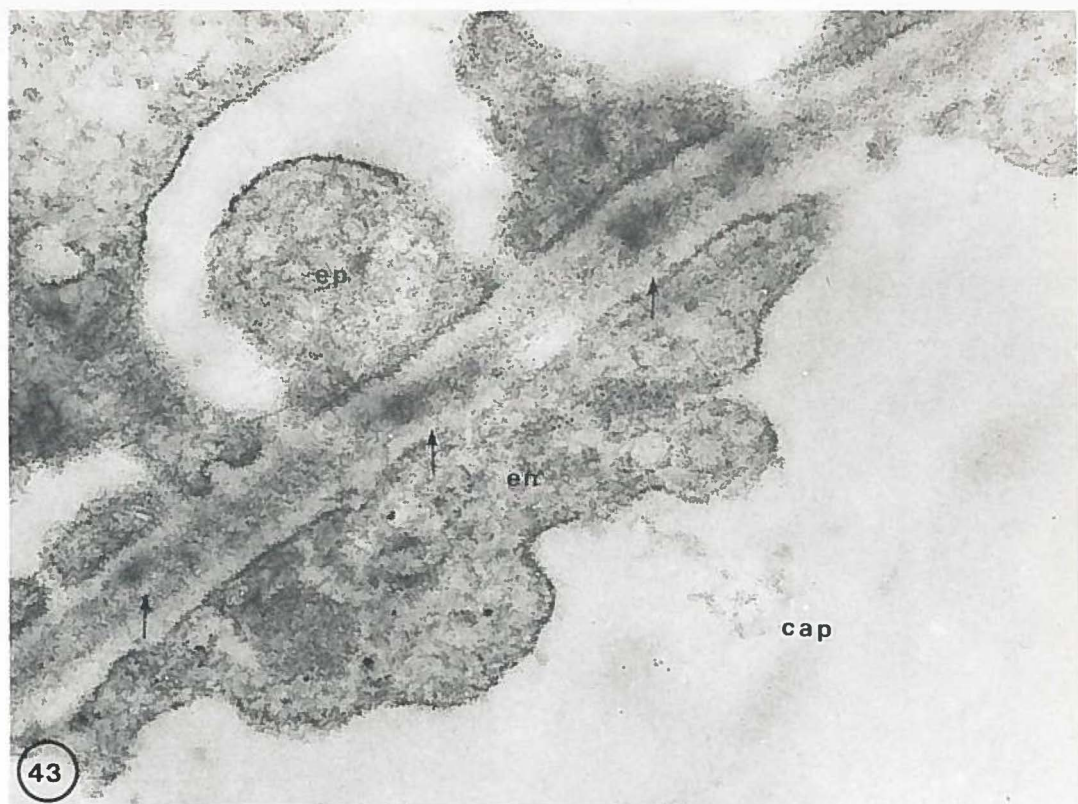


Foto 45: Imuran-vooraf. 90 dg. Kleinere immuuncomplex aggregaten liggen in de GBM. Langs het mesangium zien we aggregaten in de lamina rara interna liggen, mogelijk zelfs in het mesangium (mes), zie pijl.
ep = epitheel.
x 45000, immuno-elektronen microscopie.

Foto 46: Imuran-vooraf. 90 dg. Lokaal kan zeer duidelijk interpositie van het mesangium (mes) tussen endotheel (en) en GBM waargenomen worden. In de GBM zien we kleine immuuncomplex aggregaten (pijl).
x 40000, uranyl-lood.

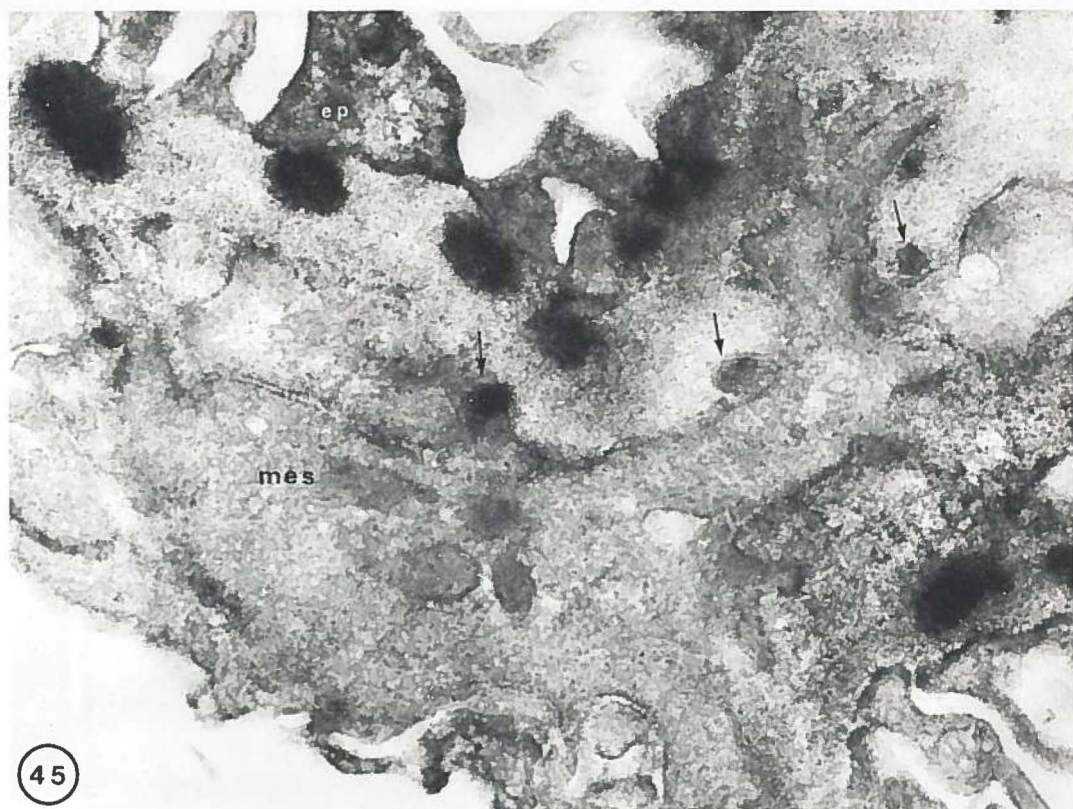


Foto 47: Imuran-gelijk. 10 dg. We zien naast kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina densa en lamina rara externa (pijl) ook enkele grotere immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa liggen (*).
x 40000, uranyl-lood.

Foto 48: Imuran-gelijk. 30 dg. Evenals in de imuran-vooraf groep kan hier op meerdere plaatsen interpositie van het mesangium (mes) tussen endotheel (en) en GBM worden gezien. In deze gebieden zien we immuuncomplex aggregaten zowel in de lamina rara externa (*), als in de lamina densa (korte pijl), alsook in de lamina rara interna (lange pijl). De GBM verloopt hier kronkelig en is duidelijk onregelmatig van dikte.
ep = epitheel.
x 40000, uranyl-lood.

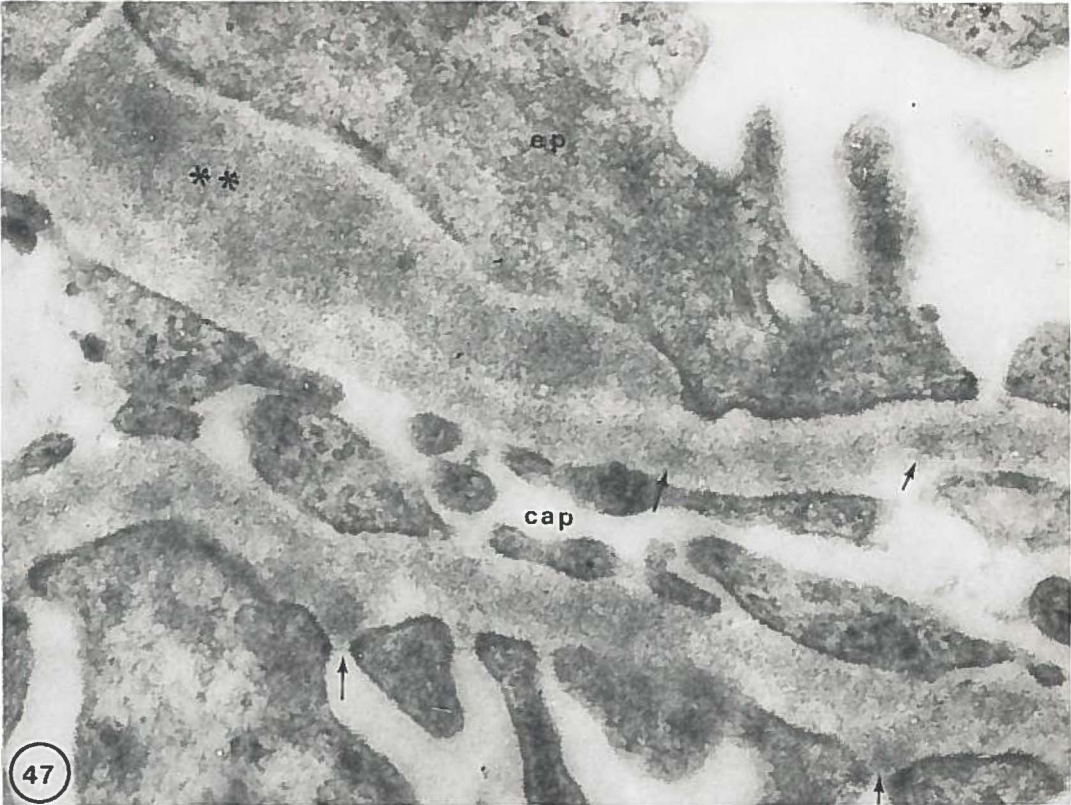


Foto 49: Imuran-gelijk. 90 dg. De verdikking van de GBM is minder uitgesproken dan in de NH (vgl f 26 t/m 29). De afgezette immuuncomplex aggregaten zijn duidelijk minder groot dan in de NH. Vaak worden ze geheel door GBM massa omgeven (pijl). Alleen in deze gebieden kan fusie van epitheel voetjes worden aangetroffen (ep-f), doch dit is een uitzondering.
x 57500, uranyl-lood.

Foto 50: Imuran-na. 14 dg. Grote immuuncomplex aggregaten liggen in de lamina rara externa (*). Hierboven zijn de epitheel (ep) voetjes gefuseerd (f). Het beeld komt geheel overeen met dat gevonden in de NH (vgl f 12).
x 57500, uranyl-lood.

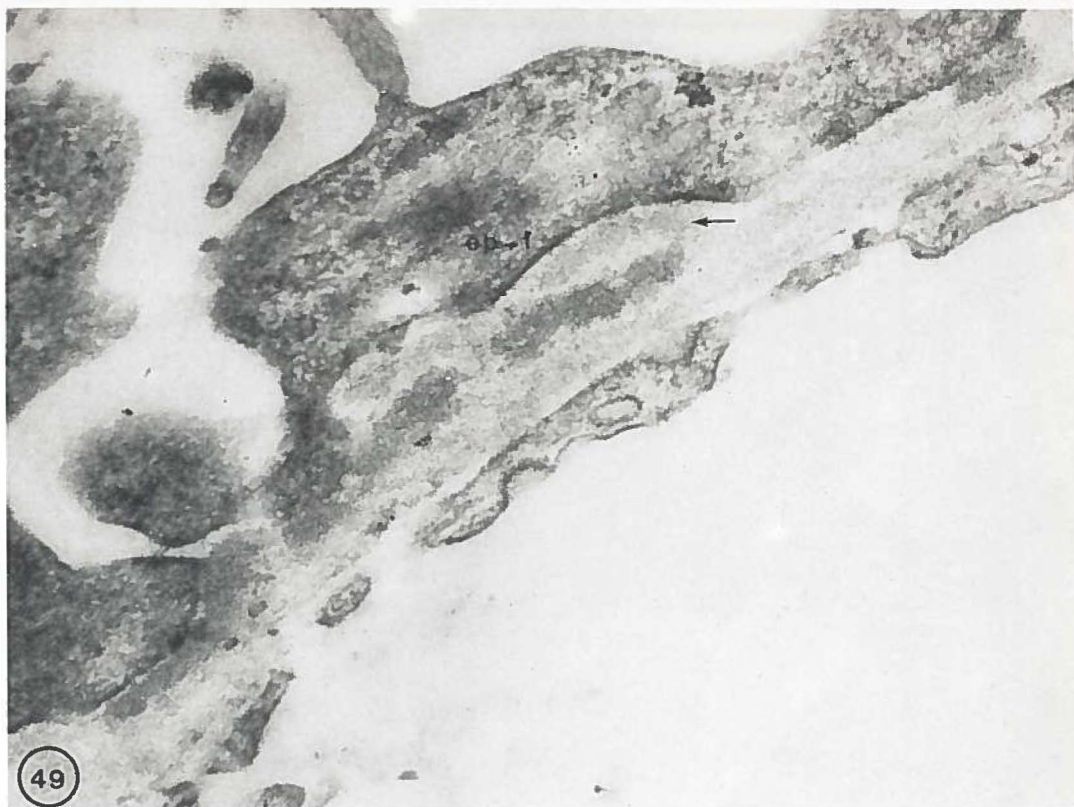


Foto 51: Imuran-na. 14 dg. Langs het mesangiale gebied zien we een toegenomen kronkeling van de GBM. De GBM is vlekkelig door de afzetting van immuuncomplex aggregaten, waarbij ook aggregaten in de lamina rara interna tegen het mesangium (mes) aan worden gezien (pijl). Het mesangium toont ook interpositie tussen endotheel (en) en GBM.
x 28700, uranyl-lood.

Foto 52: Imuran-na. 30 dg. Delen van de GBM tonen een redelijk normaal beeld (boven), hoewel ook immuuncomplex aggregaten kunnen worden gezien (korte pijl), die in grootte achter blijven t.o.v. de NH (vgl f 18). Daarnaast zien we ook onregelmatig verdikte GBM delen (zie onder), waarin grotere aggregaten in de lamina rara externa liggen (*). Een enkel immuuncomplex aggregaat lijkt in de lamina densa te liggen (lange pijl). In deze groep wordt meer fusie van epitheel (ep) voetjes gezien.
cap = capillaire lumen.
x 40000, uranyl-lood.

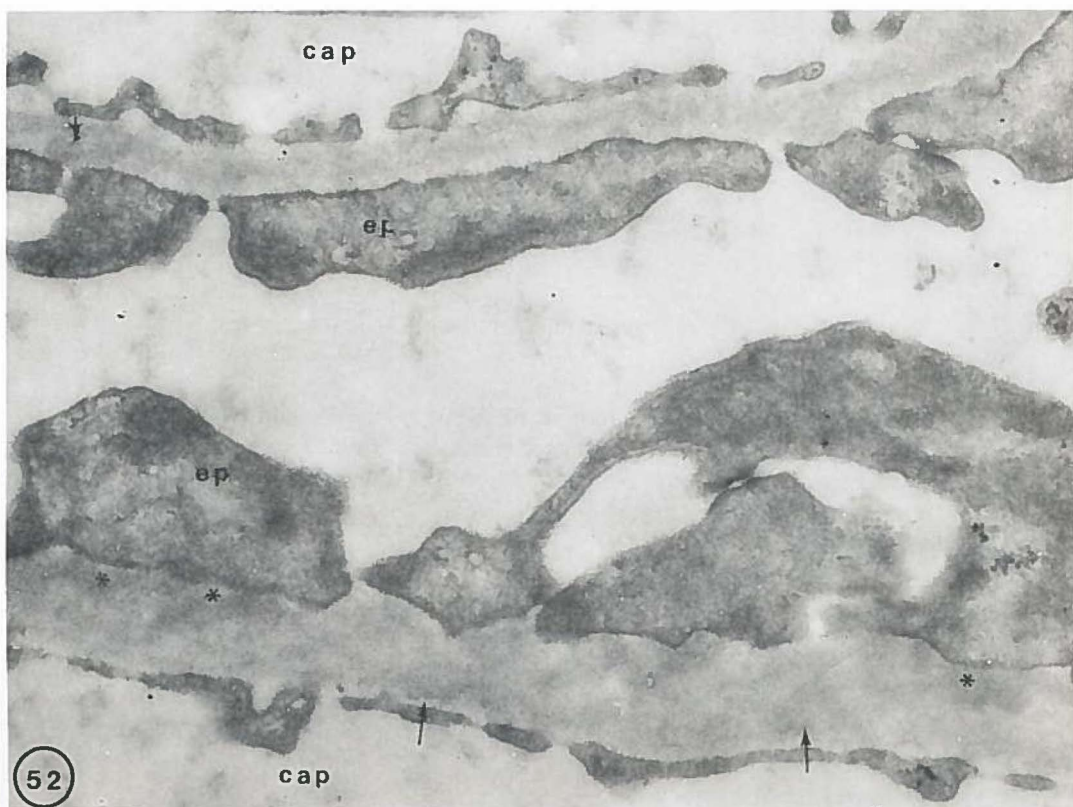
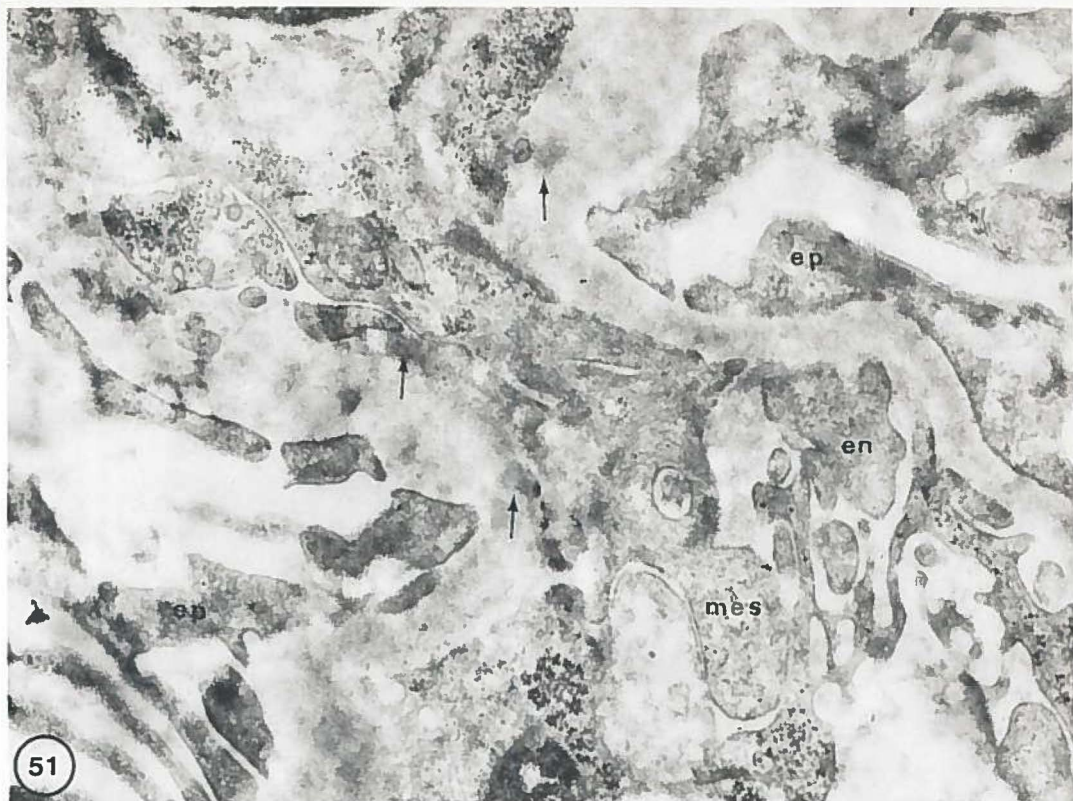


Foto 53: Imuran-na. 30 dg. Evenals in de NH (vgl f 19), kunnen na 30 dagen afzettingen van GBM substantie langs de immuuncomplex aggregaten worden waargenomen, waardoor het beeld van spikes ontstaat (pijl).

(*) = immuuncomplex aggregaat; ep = epitheel.

x 80000, uranyl-lood.

Foto 54: Imuran-na. 90 dg. De GBM is sterk gekronkeld, waarbij lokaal interpositie van mesangium (mes) tussen endotheel (en) en GBM wordt gezien. In de GBM liggen immuuncomplex aggregaten (pijl), die hoewel sub-epitheliaal gelegen, toch vaak een randje GBM substantie tussen epitheel (ep) en aggregaat hebben.

x 31000, uranyl-lood.

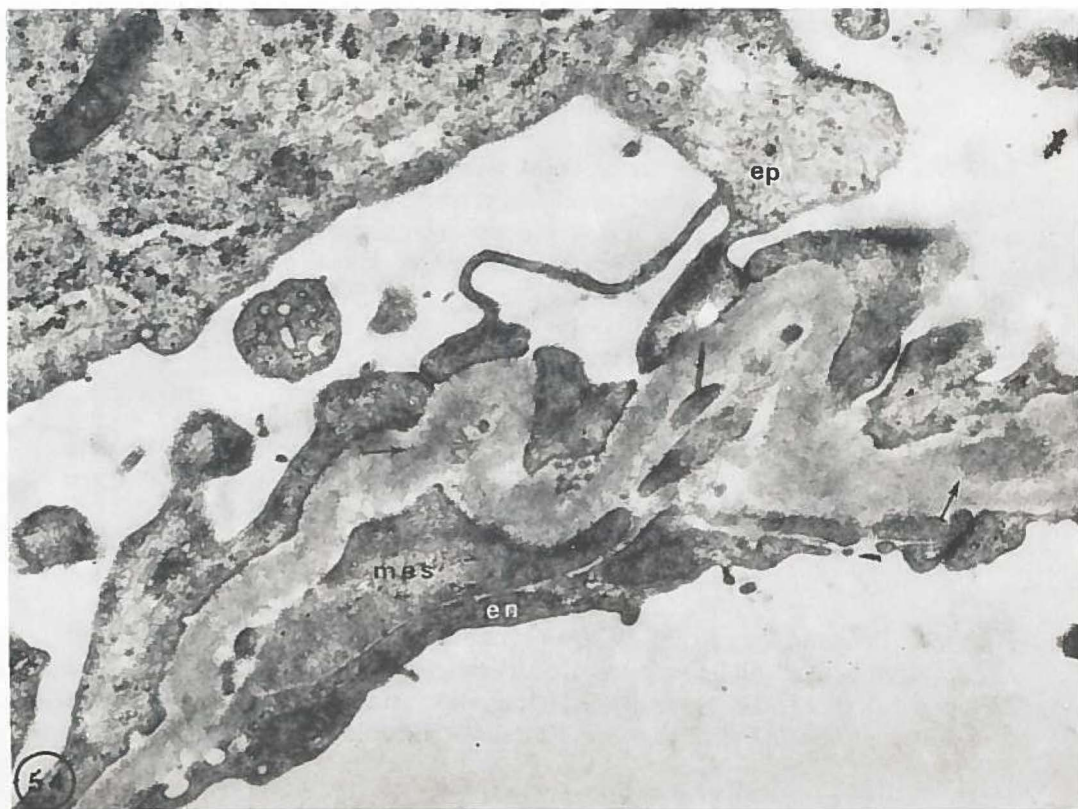


Foto 55: Imuran-na. 90 dg. In de GBM zien we naast grote immuuncomplex aggregaten, die in grootte zeker vergelijkbaar zijn met die gevonden in de NH na 90 dagen (vgl f 26 t/m 29), ook kleinere aggregaten. De immuuncomplex aggregaten liggen merendeels sub-epitheliaal, waarbij lokaal ook een aanduiding van spike vorming (pijl) is te zien.

ep = epitheel; en = endotheel.

x 62500, immuno-elektronen microscopie.

Foto 56: Endoxan-vooraf. 30 dg. De afzetting van konijnen IgG is in deze groep na 30 dagen volledig vergelijkbaar met die van de NH (vgl f 16), een diffuse deels fijn, deels grof korrelige afzetting van het konijnen IgG.

x 220, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 57: Endoxan-vooraf. 30 dg. De gevonden afzetting van ratten IgG lijkt na 30 dagen achter te blijven t.o.v. de afzettingen die gevonden worden in de NH (vgl f 5 en 17). De gevonden afzetting van ratten IgG is wel diffuus verspreid over de gehele GBM, doch het aantal fluorescerende granulae lijkt achter te blijven.

x 540, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

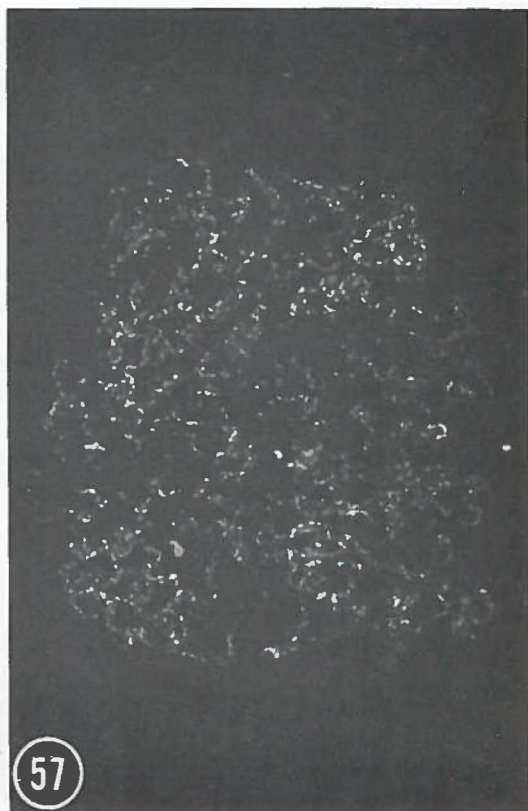
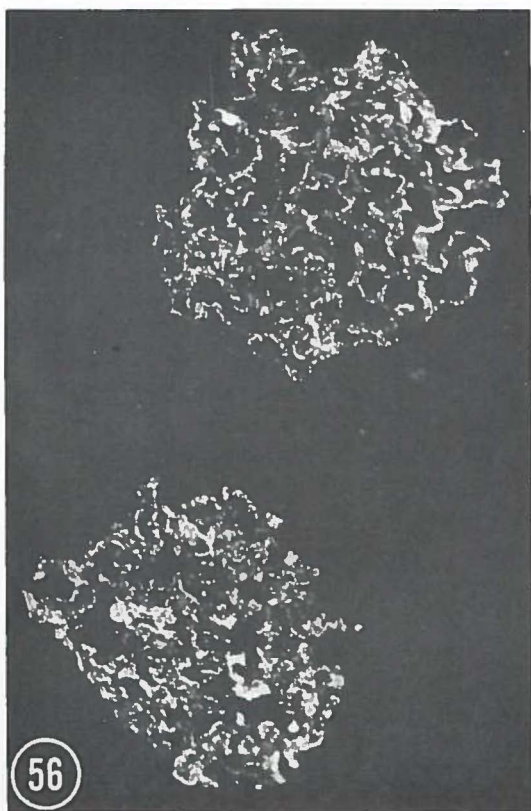


Foto 58: Endoxan-vooraf. 30 dg. De GBM lijkt normaal. Wel worden meerdere, meest kleinere immuuncomplex aggregaten in de GBM gezien. Deze zijn gelocaliseerd in de lamina rara externa tegen de lamina rara densa aan (pijl). Fusie van epitheel (ep) voetjes wordt nauwelijks gezien.

cap = capillaire lumen.

x 99500, uranyl-lood.

Foto 59: Endoxan-vooraf. 30 dg. Lokaal worden grote immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa gezien (*), waarbij opvalt dat vrijwel steeds een smalle zoom GBM substantie tussen epitheel (ep) en aggregaat aanwezig is (pijl). Een enkel aggregaat strekt zich uit van de lamina rara externa via de lamina densa tot in de lamina rara interna (**).

x 99500, uranyl-lood.

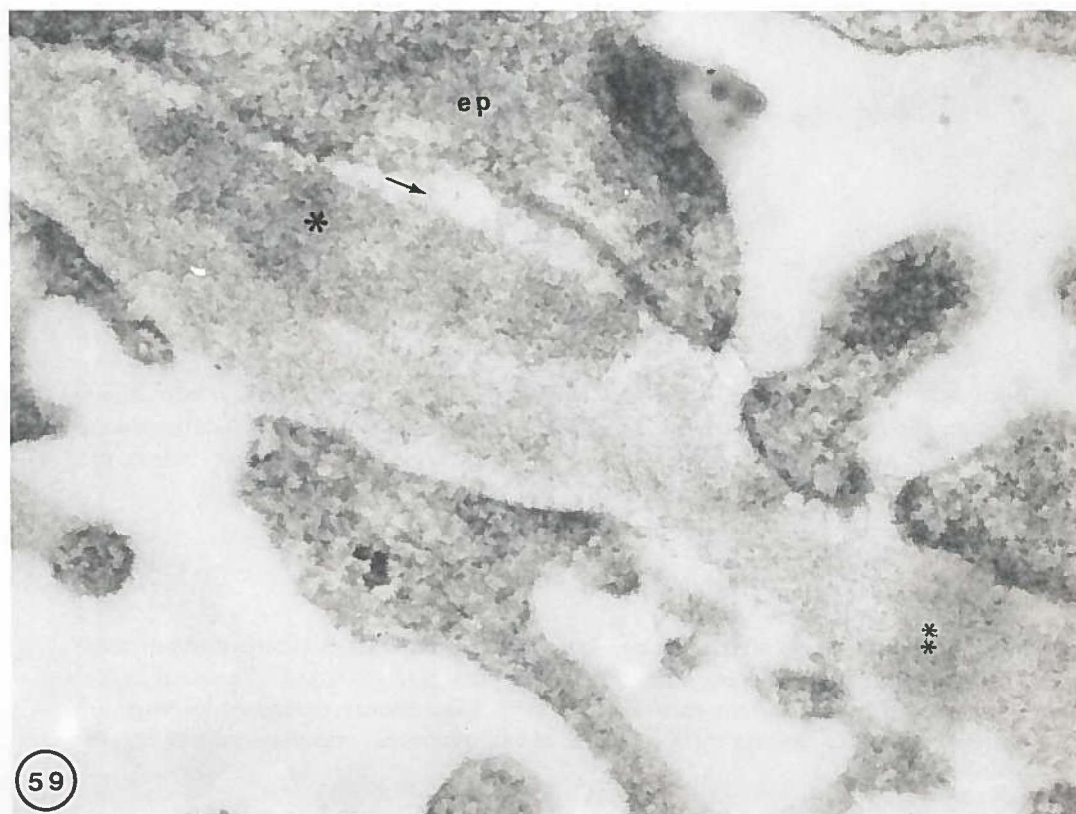


Foto 60: Endoxan-vooraf. 90 dg. We zien een diffuse afzetting van kleine immuuncomplex aggregaten in de GBM. Merendeels zijn deze gelocaliseerd op de grens van de lamina densa-lamina rara externa (*), doch ook wordt een enkel aggregaat in de lamina rara interna gezien (pijl).

ep = epitheel; cap = capillaire lumen.

x 62500, uranyl-lood.

Foto 61: Endoxan-vooraf. 90 dg. Lokaal worden naast kleinere immuuncomplex aggregaten op de grens lamina densa-lamina rara externa (*), grotere aggregaten gezien in de lamina rara externa (**). Hier wordt tevens spike vorming gezien (pijl). De lamina rara interna bevat eveneens immuuncomplex aggregaten (O).

x 71800, uranyl-lood.

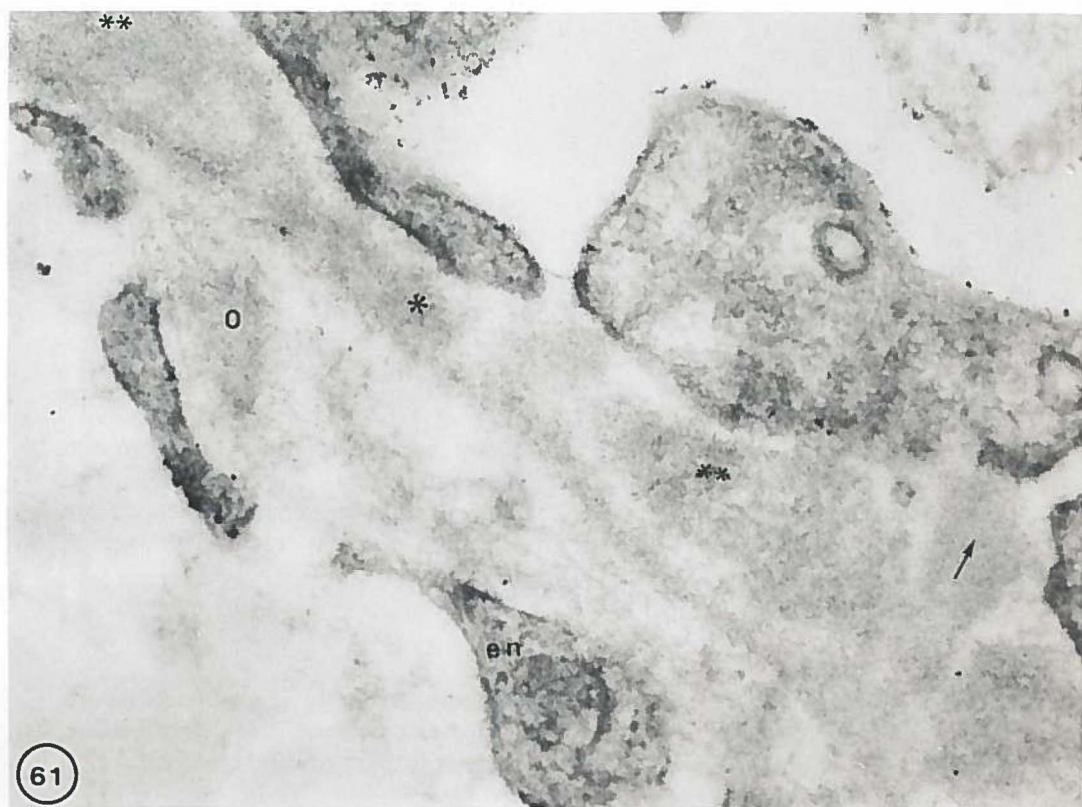


Foto 62: Endoxan-vooraf. 90 dg. Langs het mesangium (mes) zien we een sterkgekronkelde GBM. Er is toename van matrix (ma). De afzettingen van immuuncomplex aggregaten worden merendeels sub-epitheliaal gezien (korte pijl), doch er worden ook aggregaten op andere plaatsen in de GBM gezien (lange pijl).

x 22500, uranyl-lood.

Foto 63: Endoxan-na. 30 dg. De afzetting van ratten IgG, gevonden na 30 dagen, is diffuus langs de GBM in een fijn korrelig patroon, doch de afzetting lijkt duidelijk achter te blijven in vergelijking met de NH na 30 dagen (vgl f 17).
x 540, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

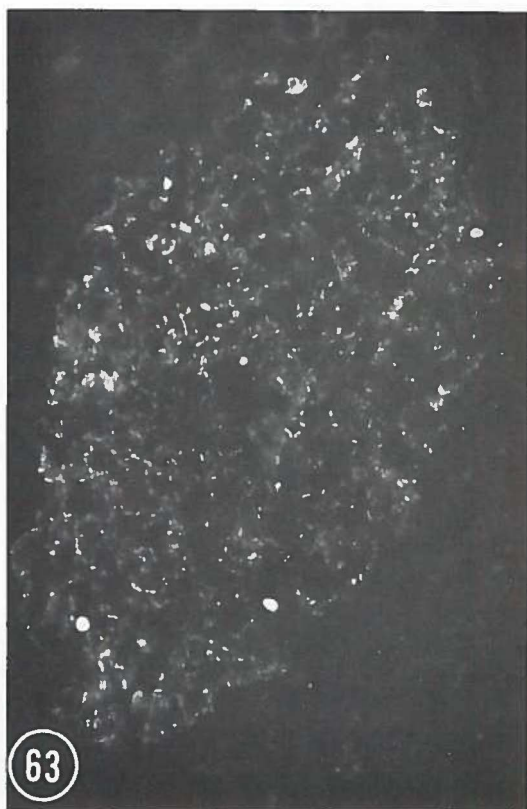
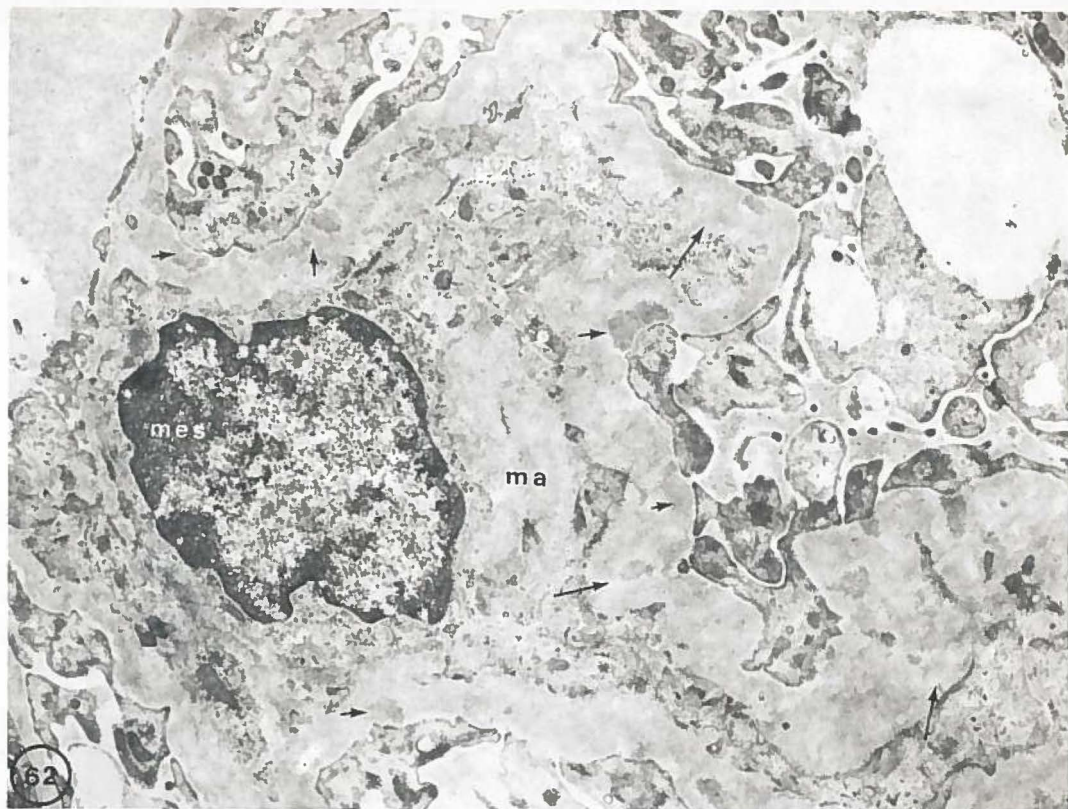


Foto 64: Endoxan-na. 30 dagen. Grote immuuncomplex aggregaten liggen in de lamina rara externa (**). Daarnaast zien we ook enkele aggregaten sub-endotheliaal (pijl). Boven de sub-epitheliaal gelegen aggregaten wordt fusie van epitheel (ep) voetjes waargenomen.

en = endotheel.

x 99500, uranyl-lood.

Foto 65: Endoxan-na. 90 dg. De GBM is onregelmatig verdikt. We zien immuuncomplex aggregaten van wisselende grootte (*). De aggregaten zijn merendeels omgeven door GBM substantie, terwijl lokaal ook spike vorming kan worden waargenomen (pijl).

ep = epitheel; cap = capillaire lumen.

x 36750, uranyl-lood.

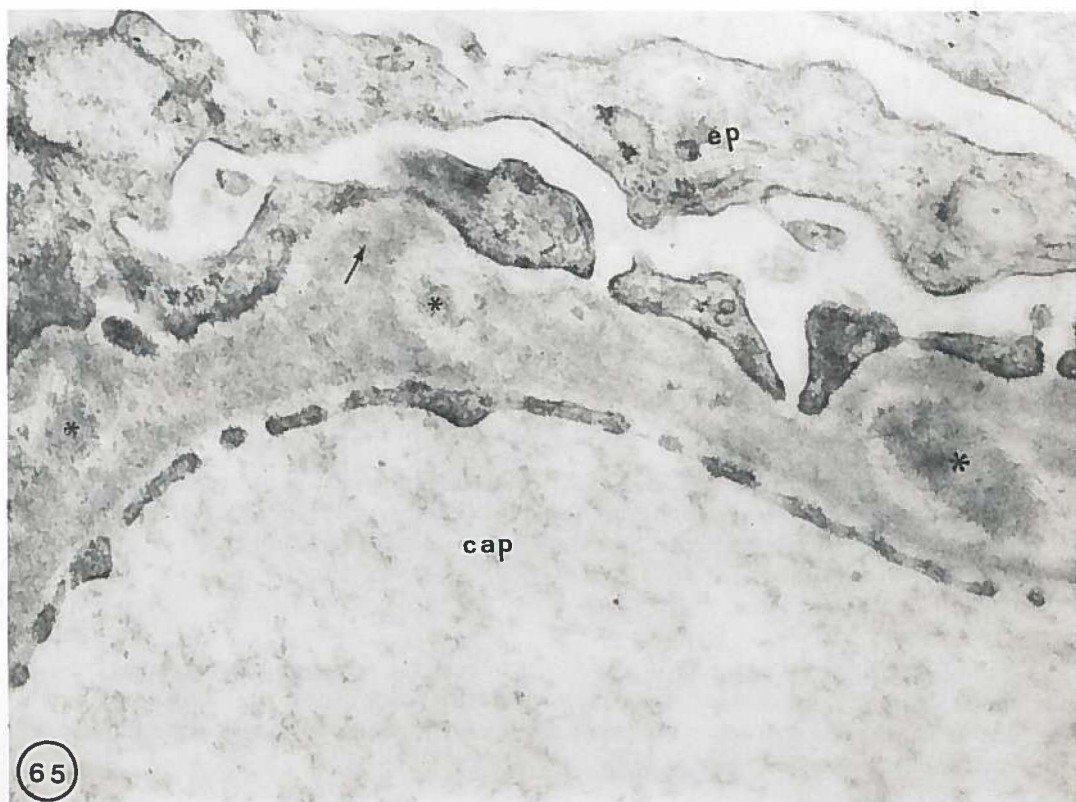


Foto 66: Endoxan-na. 90 dg. Lokaal kan een duidelijke interpositie van het mesangium (mes) tussen endotheel (en) en GBM worden gezien. Afzettingen van immuuncomplex aggregaten bevinden zich in de GBM (pijl).
x 22750, uranyl-lood.

Foto 67: Indocid-vooraf. 2 dg. We zien enkele kleine immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa, vaak in de slit pores (korte pijl). Veel van de kleine aggregaten worden echter vooral langs het mesangium (mes) in de lamina rara interna gevonden (lange pijl).
x 31350, uranyl-lood.

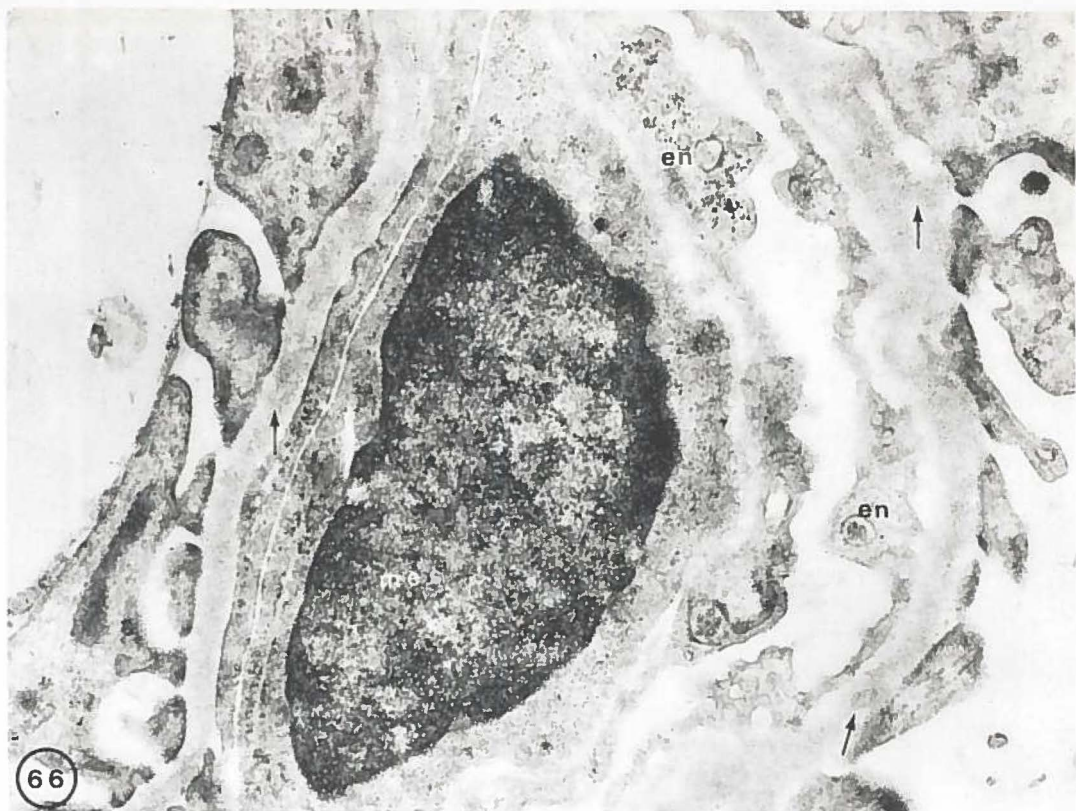


Foto 68: Indocid-vooraf. 30 dg. Er worden slechts weinig immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa aangetroffen (*). Deze aggregaten zijn kleiner dan in de NH na 30 dagen (vgl f 18). We zien meerdere aggregaten in de lamina densa liggen (korte pijl), terwijl lokaal de lamina rara interna afzettingen van immuuncomplexen bevat (lange pijl). Er is geen fusie van epitheel (ep) voetjes.

en = endotheel.

x 51300, uranyl-lood.

Foto 69: Indocid-vooraf. 30 dg. In de lamina rara interna zien we veel immuuncomplex aggregaten (pijl). Er is geen fusie van epitheel (ep) voetjes.

cap = capillaire lumen; en = endotheel.

x 51300, glycogeen kleuring.



Foto 70: Indocid-vooraf. 30 dg. Langs het mesangium (mes) worden immuun-complex aggregaten in de lamina rara interna gezien (*). Soms lijkt het mesangium rond deze aggregaten te liggen (pijl). Het epitheel (ep) toont geen fusie van voetjes.

x 80000, uranyl-lood.

Foto 71: Indocid-vooraf. 90 dg. De afzetting van konijnen IgG is diffuus langs de GBM. Het aantal afgezette fluorescerende granulae lijkt duidelijk minder groot dan in de NH na 90 dagen (vgl f 21).

x 540, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 72: Indocid-vooraf. 90 dg. De afzetting van ratten IgG na 90 dagen is zeker gelijkwaardig aan die in de NH (vgl f 22).

x 540, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.



Foto 73: Indocid-vooraf. 90 dg. We zien een vlekkerige lamina densa door afzettingen van immuuncomplex aggregaten. Daarnaast worden afzettingen van aggregaten in de lamina rara interna gezien (pijl).

ep = epitheel; en = endotheel.

x 99750, uranyl-lood.

Foto 74: Indocid-vooraf. 90 dg. Indien immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa zijn gelocaliseerd, dan zien we steeds spike vorming optreden (pijl). Het merendeel der aggregaten ligt echter in de lamina densa (*) of in de lamina rara interna (zie f 73).

ep = epitheel; cap = capillaire lumen; en = endotheel.

x 80000, uranyl-lood.



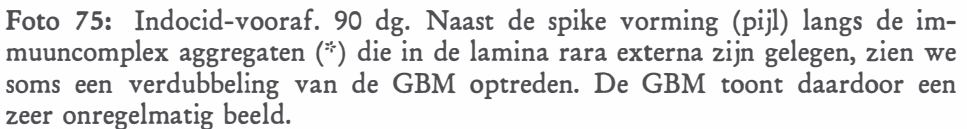


Foto 75: Indocid-vooraf. 90 dg. Naast de spike vorming (pijl) langs de immuuncomplex aggregaten (*) die in de lamina rara externa zijn gelegen, zien we soms een verdubbeling van de GBM optreden. De GBM toont daardoor een zeer onregelmatig beeld.

ep = epitheel; cap = capillaire lumen.

x 37000, uranyl-lood.

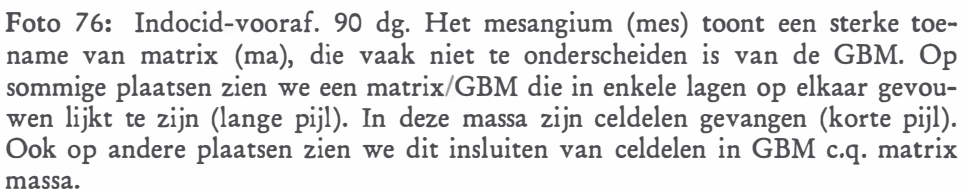


Foto 76: Indocid-vooraf. 90 dg. Het mesangium (mes) toont een sterke toename van matrix (ma), die vaak niet te onderscheiden is van de GBM. Op sommige plaatsen zien we een matrix/GBM die in enkele lagen op elkaar gevouwen lijkt te zijn (lange pijl). In deze massa zijn celdelen gevangen (korte pijl). Ook op andere plaatsen zien we dit insluiten van celdelen in GBM c.q. matrix massa.

ep = epitheel.

x 13750, uranyl-lood.



Foto 77: Indocid-gelijk. 90 dg. De afzettingen van konijnen IgG zijn diffuus door de glomerulus langs de GBM te zien. Het is een fijn korrelige afzetting, die echter minder uitgesproken is dan in de NH (vgl f 21).
x 540, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 78: Indocid-gelijk. 90 dg. De afzetting van ratten IgG toont een deels fijn, deels grof korrelig karakter. De afzetting lijkt zeker niet achter te blijven in vergelijking tot de NH (vgl f 22).
x 540, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

Foto 79: Indocid-gelijk. 90 dg. De GBM is onregelmatig verdikt. De afgezette immuuncomplex aggregaten (*) liggen of in de lamina densa, of op de grens lamina densa-lamina rara externa. Vaak is een aanduiding van spike vorming te zien (pijl). Een enkel klein aggregaat lijkt in de lamina rara interna te liggen(**).
ep = epitheel; cap = capillaire lumen.
x 61700, uranyl-lood.

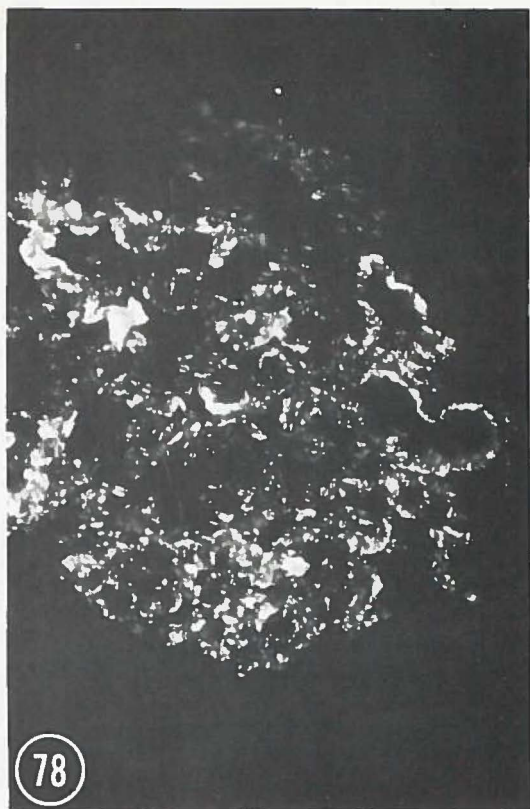
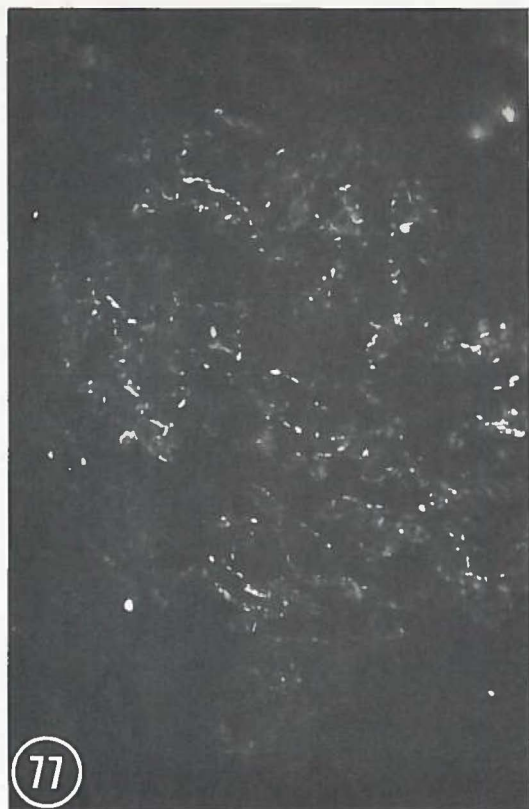


Foto 80: Indocid-gelijk. 90 dg. Langs het mesangiale gebied (mes) zien we een zeer onregelmatige GBM, waarbij vooral de lamina rara interna verbreed is. In dit gebied worden meerdere immuuncomplex aggregaten gezien, die vaak omgeven worden door mesangium (pijl). Er zijn ook immuuncomplex aggregaten in de lamina rara externa gelegen. Hier is meestal een aanduiding van spike vorming te zien (*). Er lijkt geen fusie van epitheel (ep) voetjes aanwezig.
x 22500, uranyl-lood.

Foto 81: Indocid-na. 30 dg. De afzetting van konijnen IgG is diffuus deels fijn, deels grof korrelig langs de GBM. Het fluorescentie beeld is geheel gelijkwaardig aan dat van de NH (vgl f 16).
x 220, fluorescentie met geit anti konijnen IgG.

Foto 82: Indocid-na. 30 dg. De afzetting van ratten IgG doet qua karakter en sterkte geenszins onder voor die van konijnen IgG (vgl f 81). Deze afzetting is zeker gelijkwaardig aan die gezien in de NH (vgl f 17).
x 220, fluorescentie met konijnen anti ratten IgG.

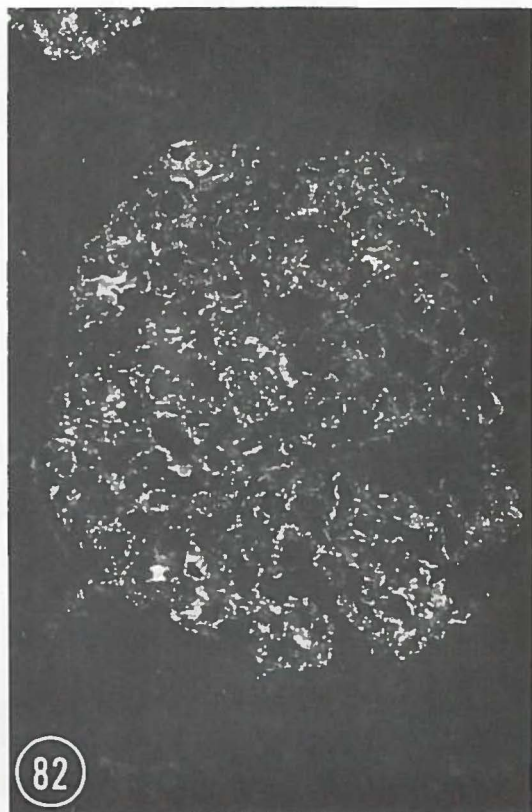
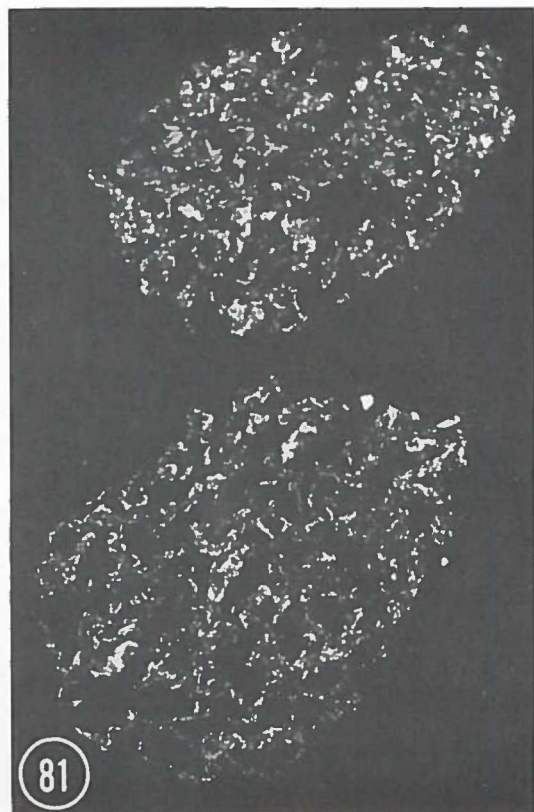
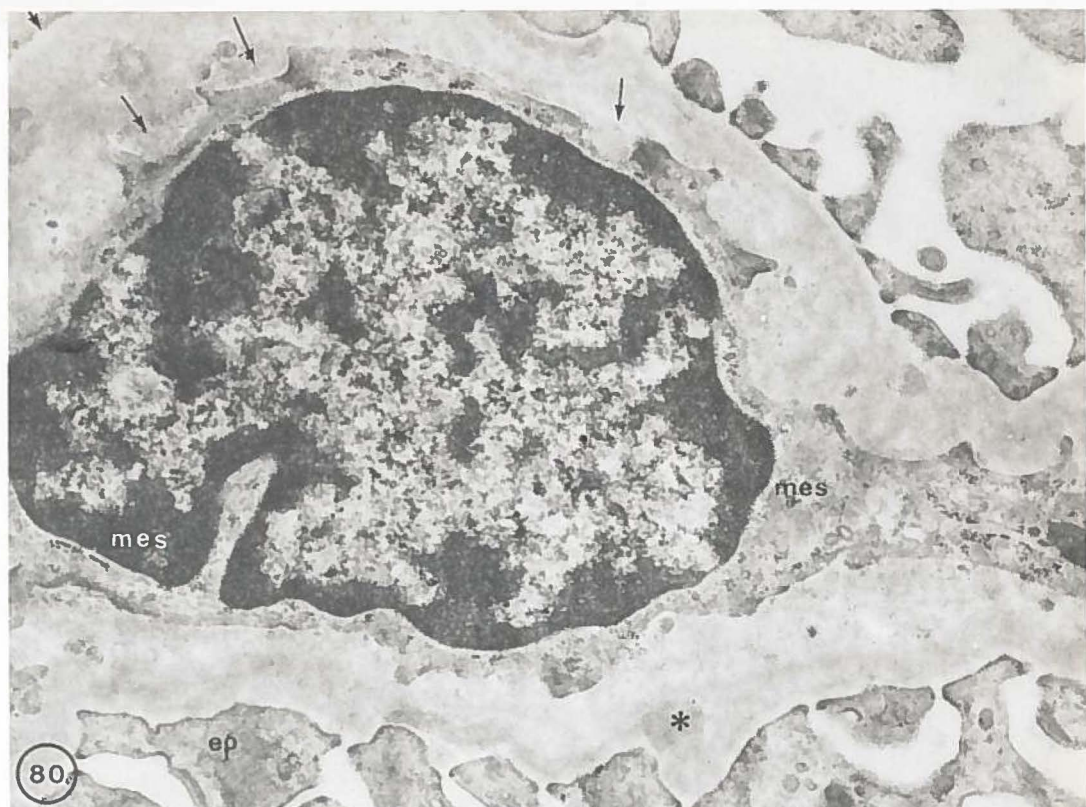
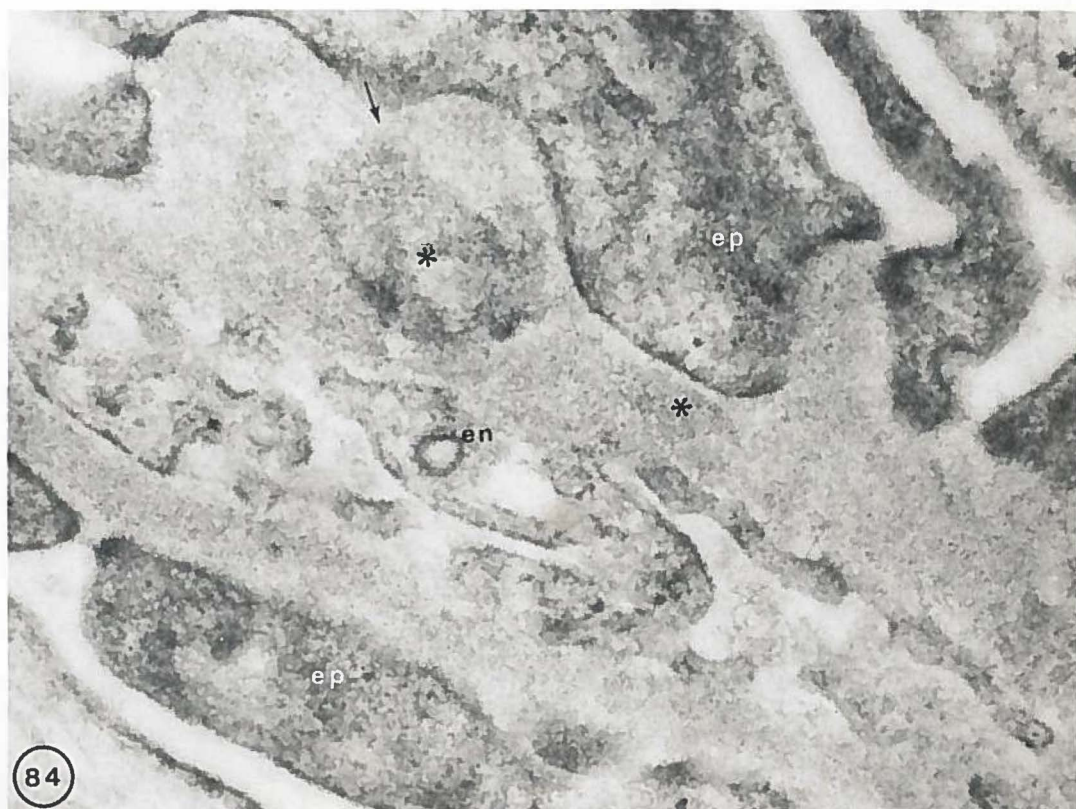
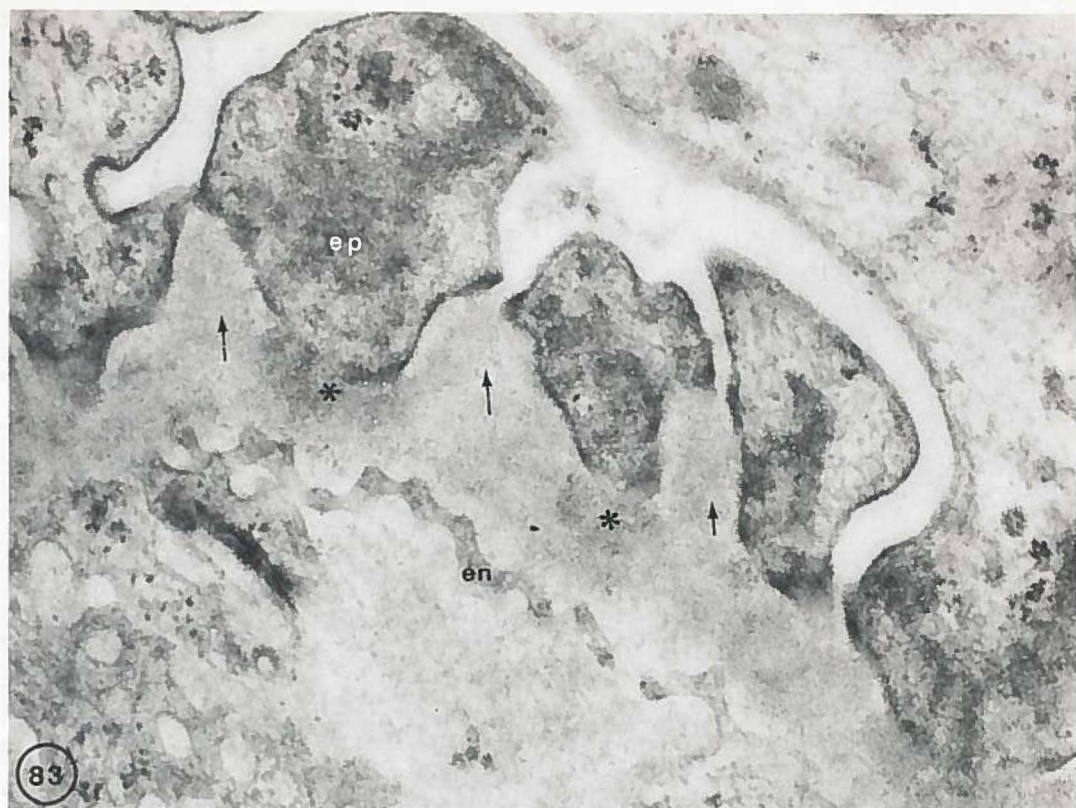


Foto 83: Indocid-na. 30 dg. Immuuncomplex aggregaten liggen in de lamina rara externa (*). Er is een sterke spike vorming waarneembaar (pijl). Toch toont het epitheel (ep) geen fusie van de voetjes.
x 51300, uranyl-lood.

Foto 84: Indocid-na. 90 dg. Er is een sterke spike vorming te zien, waarbij kan worden waargenomen dat de spikes het immuuncomplex aggregaat (*) „omarmen” (pijl). De GBM is door deze spike vorming onregelmatig verdikt. Toch lijken de aggregaten minder groot te zijn dan in de NH (vgl f 26 t/m 29).
ep = epitheel; en = endotheel.
x 62500, uranyl-lood.



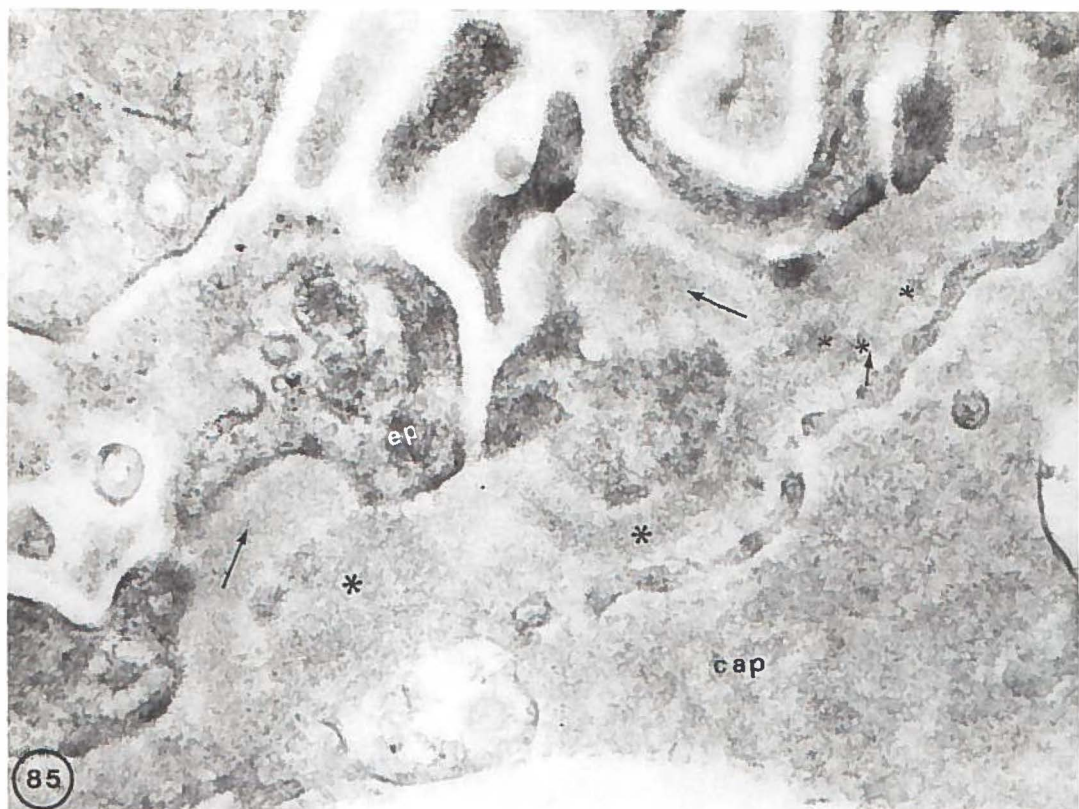


Foto 85: Indocid-na. 90 dg. Door de zeer sterke spike vorming is de GBM onregelmatig verdikt. Een localisatie van de immuuncomplex aggregaten (*) is vaak moeilijk. Soms krijgen we de indruk dat ze in de lamina densa zijn gelegen (korte pijl). Er treedt geen duidelijke fusie van de epitheel (ep) voetjes op. spikes - zie lange pijl; cap = capillaire lumen.
x 45000, uranyl-lood.